

**MECHANISIRTER RADIOIMMUNOASSAY
FÜR CORTISOL
UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT***

Marianne Krick

1977

*Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR.MED. E.BUCHBORN

MECHANISIERTER RADIOIMMUNOASSAY FÜR CORTISOL

UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT ⁺

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN

AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

Marianne Krick
geb. Schmidberger

aus Friedberg

1977

⁺ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.P.C.Scriba

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.E.Buchborn

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. August 1977.



Sehr geehrte Eltern!

Ich habe heute einen Brief geschrieben, in dem ich Ihnen meine Gedanken
über die Zukunft meines Lebens mitteilen möchte.

Ich habe mich sehr Gedanken gemacht über die Zukunft und was
ich erreichen möchte.

Ich möchte ein Arzt werden, um anderen Menschen zu helfen.
Ich möchte ein Leben lang lernen und mich weiterbilden.
Ich möchte ein Leben lang glücklich sein und meine Familie
lieben.

Meinen lieben Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0068

Danken möchte ich

Herrn Professor Dr.med. P.C.Scriba für die freundliche
Überlassung des Themas,

Herrn Dr.med.O.A.Müller für die Betreuung bei der
Verfassung dieser Arbeit,

Herrn Henner für den Rat in technischen Fragen,
Herrn Bestler für die Hilfe bei der Anfertigung der
Zeichnungen, Fräulein F. Haag für die Herstellung
der Abbildungen.

I N H A L T

<u>Kapitel</u>	<u>Seite</u>
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. METHODIK UND VORVERSUCHE</u>	4
2.1. Prinzip	4
2.2. Material und Reagenzien	4
2.2.1. Radioaktiver Arbeitsstandard	4
2.2.2. Kalter Hormonstandard	5
2.2.3. Nachwaschserum	5
2.2.4. Säulenpräparation	5
2.2.5. Cortisol-Antikörper-Lösung	6
2.2.6. Testansatz	6
2.2.7. β -Szintillationszählung	7
2.3. Vorversuche zur Optimierung des Assays	8
2.3.1. Chromatoparttechnik - Batchtechnik	8
2.3.2. Verkleinerung des Säulenvolumens	8
2.3.3. Verschiedene Gele bzw. Adsorbentien	8
2.3.4. pH-Wert und Molarität des Puffers	10
2.3.5. Pumpgeschwindigkeit	10
2.3.6. Testung verschiedener Plasmaexpander als Ersatz für das Nachwaschserum	13
2.3.7. Schlußfolgerungen aus den Vorversuchen	13
2.4. Mechanisierung	14
2.4.1. Apparatur für den mechanisierten Cortisol-RIA	14
2.4.2. "Sartorius-Membranfilter-Gerät"	14
2.5. Eichkurve und Auswertung der Zählergebnisse	17
2.6. Versuche zur radioimmunologischen Bestimmung des freien Cortisols im Urin	19
<u>3. ERGEBNISSE</u>	23
3.1. Qualitätskontrolle	23
3.1.1. Präzision	23
3.1.1.1. Intraassay-Variationskoeffizient	23
3.1.1.2. Interassay-Variationskoeffizient	23
3.1.2. Richtigkeit (Wiederfindung)	24

<u>Kapitel</u>	<u>Seite</u>
3.2. Untersuchungen zur Spezifität des Cortisol-RIA	24
3.2.1. Endogene Steroide	24
3.2.2. Therapeutisch eingesetzte Substanzen als Störfaktoren	24
3.3. Kapazität	27
3.4. Normalwerte	27
3.4.1. 9.00 Uhr-Nüchternwerte	27
3.4.2. ACTH-Belastungstest bei endokrin gesunden Patienten und Klinikpersonal	29
3.4.3. Dexamethason-Hemmtest	32
3.4.4. Cortisolspiegel unter einem Insulinhypoglykämietest	32
3.4.5. 9.00 Uhr-Nüchternwerte bei schwangeren Patientinnen und bei Patientinnen unter Antiovalantientherapie	34
3.5. Erkrankungen des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems	36
3.5.1. Patienten mit Nebennierenrindeninsuffizienz	36
3.5.2. Patienten mit Cushing-Syndrom	37
3.6. Vergleichende Untersuchungen zur Spezifität verschiedener radioimmunologischer Bestimmungsmethoden mit demselben Antikörper	38
<u>4. DISKUSSION</u>	44
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	48
<u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u>	49

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M	molar
Mol, mMol	Mol, Millimol
N	normal
Ci, mCi, µCi	Curie, Millicurie, Mikrocurie
³ H	Tritium
CPM	Counts pro Minute
S.A.	Spezifische Aktivität
B	Antikörpergebundenes ³ H-Cortisol
F	freier Cortisolanteil
RIA	Radioimmunoassay
CPBA	Competitive Proteinbindungsanalyse
AK	Antikörper
CBG	Corticosteroid-binding-globulin
NWS	Nachwaschserum
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
NNR	Nebennierenrinde
IHT	Insulinhypoglykämietest
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AO	Antiovalantien
GH	growth hormone = Wachstumshormon
U	Umdrehungen
g	Erdbeschleunigung = 9,81 m/sec
v	Geschwindigkeit
°C	Grad Celsius
$\bar{x}$	Mittelwert
s	Standardabweichung
VK	Variationskoeffizient

LISTE DER PRÄPARATE

Sephadex G-10, LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Cortisol-1,2,3-³H, S.A. 55 Ci/mMol (The Radiochemical Centre,
Amersham, England)
Florisil (Fa. Serva)
Cortisol (11 β , 17 α , 21-Trihydroxypregn-4-en-3,20-dion)
Corticosteron (11 β , 21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion)
Progesteron (Pregn-4-en-3,20-dion)
17 α -Hydroxyprogesteron (17 α -Hydroxypregn-4-en-3,20-dion)
11-Desoxycortisol (17 α , 21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion)
Testosteron (17 β -Hydroxyandrost-4-en-3-on)
Östradiol (Östra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol)
Cortison (Schering AG., Berlin)
Prednison (Decortin^R)
Betamethason (Celestan^R, Byk-Essex, München)
Prednisolon (Decortin^R-H)
Dexamethason (Fortecortin^R)
9 α -Fluorhydrocortison (Astonin^R-H)
Fludrocortison (Fludrocortison SQUIBB^R, Heyden, München)
Methylprednisolon (Urbason^R, Hoechst, Frankfurt)
Triamcinolon (Volon^R, Heyden, München)
Spironolacton (Aldactone^R, Boehringer, Mannheim)
Carbenoxolon (Biogastrone^R, Homburg, Frankfurt)
Haemaccel^R (Behringwerke AG., Marburg)
Macrodex^R (Knoll AG., Ludwigshafen)
Rheomacrodex^R (Knoll AG., Ludwigshafen)
Periston^R-N (Bayer AG., Leverkusen)
Unisolve (Fa. Zinsser, Frankfurt)

Alle in dieser Liste genannten Präparate ohne Firmenangabe,
sowie die hier nicht aufgeführten Substanzen stammten von der
Firma Merck AG., Darmstadt.

1.

EINLEITUNG

Struktur des Cortisols

Die Nebennierenrindenhormone bilden zusammen mit den Hormonen aus den Gonaden die Gruppe der Steroidhormone. Ihnen gemeinsam ist das Cyclopentanoperhydrophenanthren-Gerüst. Alle Steroidhormone lassen sich auf das Cholesterin zurückführen, aus dem auf enzymatischem Weg die entsprechenden Hormone aufgebaut werden. Die einzelnen Steroidhormone unterscheiden sich also nur durch Struktureigentümlichkeiten im Molekül. So besitzen z.B. die Glucocorticoide mehr Hydroxylgruppen als die Mineralocorticoide (31, 58, 61).

Regulation der Cortisolsekretion

Die Regulation der Cortisolsekretion im Plasma erfolgt durch einen Reglerkreis, der in der Kybernetik als Reglerkreis mit negativer Rückkopplung und variabler Einstellung bezeichnet wird (32).

Sinkt der Plasmacortisolspiegel unter einen bestimmten Wert, oder gelangen Reize, die die Cortisolsekretion fördern, zum Hypothalamus, so antwortet dieser mit der Ausschüttung des Neurohormons CRF (=Corticotropin Releasing Factor). Dieses wiederum stimuliert die Adenohypophyse zur Sekretion von Corticotropin (ACTH), welches die Cortisolproduktion und -sekretion steigert. Andererseits wirkt Cortisol im Sinne eines Feedback-Mechanismus hemmend auf die Abgabe von CRF und Corticotropin (ACTH).

Wirkungen des Cortisols

Die Wirkungen des Cortisols im Gesamtorganismus umfassen vor allen Dingen die Gluconeogenese in der Leber und den katabolen Effekt im Eiweißstoffwechsel. Erwähnt werden müssen außerdem die insulin-antagonistische Wirkung im Kohlenhydratstoffwechsel und die mineralocorticoidähnliche Wirkung auf den Elektrolythaushalt (Natriumretention, Kaliumausscheidung).

Therapeutisch hat man sich die antiphlogistische Wirkung des Cortisols bzw. der synthetischen Derivate zunutze gemacht. Sie findet ihren Ausdruck in der Beeinflussung der exsudativen und proliferativen Phase des Entzündungsgeschehens. Die Immunität beeinflusst Cortisol über die Hemmung der Antikörperbildung und des lymphatischen Systems (10, 51).

Radioimmunologische Cortisolbestimmung

Im Jahre 1959 war es BERSON und YALOW gelungen, den Plasmainsulinspiegel radioimmunologisch zu bestimmen (3). Zur selben Zeit hatten Forscher der Columbia- und McGill-Universität bereits Methoden zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen Steroidhormone veröffentlicht. Die kommerzielle Herstellung von radioaktiv markierten Hormonen bedeutete einen weiteren Fortschritt. Große Ähnlichkeit bezüglich des Methodenprinzips mit dem von BERSON und YALOW erstmals beschriebenen RIA für Insulin hatte die von MURPHY et al. veröffentlichte Proteinbindungsanalyse für Cortisol (40, 41). Bei dieser CPBA wurde als bindendes Protein das CBG (Transcortin-reiches Serum), also kein Antikörper eingesetzt. In den folgenden Jahren wurde das Prinzip der "Sättigungsanalyse" (B.E.P.MURPHY) auch außerhalb der endokrinologischen Forschung angewandt (55, 64).

Eigene Fragestellung

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode zur radioimmunologischen Bestimmung von Cortisol im Serum baut auf frühere Arbeiten zur Mechanisierung einer CPBA (Competitive Proteinbindungsanalyse) für Plasmacortisol auf (6, 7, 38). Es war auf Grund der reversiblen Adsorption von Cortisol an das Dextrangel erstmals möglich gewesen, eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln zu vermeiden. Die drei wesentlichen Schritte, die Freisetzung des Cortisols aus seinen Proteinbindungen, die Reaktion mit einem CBG-reichen Serum und die Trennung von gebundenem und freiem Cortisolanteil finden dabei auf derselben Säule statt, was eine Mechanisierung möglich machte. Nach Vorversuchen (7, 38) war dieses Methodenprinzip auch bei Einsatz eines Antikörpers statt CBG-reichem Serum anwendbar.

Ziel dieser Arbeit war die "Optimierung" des Cortisol-RIA nach diesem Methodenprinzip im Hinblick auf den Einsatz dieser Methode für klinische Serummessungen. Hierbei standen uns zwei verschiedene Antiseren (Kaninchen-Antiserum gegen C 21-Hemisuccinat-BSA-Konjugat des Cortisons, Dr. BIDLINGMAIER, Kinderklinik der Universität München; Antiserum gegen Cortisol-21-Hemisuccinat-Rinderalbumin-Komplex, Professor VECSEI, Heidelberg) zur Verfügung. Die Spezifität der beiden Antikörper wurde bezüglich endogener Steroide, therapeutisch eingesetzter Corticoide und anderer Substanzen genau geprüft. Außerdem untersuchten wir die Spezifität des in dieser Arbeit beschriebenen mechanisierten RIA im Vergleich mit zwei anderen radioimmunologischen Methoden für Cortisol, nämlich einem üblichen RIA mit Dichlormethanextraktion, Inkubation und B/F-Trennung mit Kohle-Dextran ohne bzw. mit Vorreinigung. Alle drei radioimmunologischen Bestimmungen wurden mit demselben Antiserum durchgeführt (Dr. BIDLINGMAIER, Universitätskinderklinik, München).

2. METHODIK UND VORVERSUCHE

2.1. Prinzip

Cortisol bzw. ^3H -Cortisol sowie andere Steroide werden auf sauren (N/10 HCl) Sephadex G-10 Säulen quantitativ aus dem Serum extrahiert und reversibel an die Gelmatrix gebunden. Durch Ansäuern des Testansatzes und die sauer äquilibrierten Säulen erreicht man eine vollständige Zerstörung der Proteinbindung. Nach Umpufferung (pH 8,0) wird mit einer Cortisol-Antikörper-Lösung (Kap.2.2.5.) und anschließend mit einer Pufferlösung eluiert. Es erfolgte also - ohne Inkubation - auf der umgepufferten Säule die eigentliche Bindungsreaktion von Cortisol und ^3H -Cortisol mit dem Antikörper. Dieser Antikörper-gebundene Anteil wird in einem ersten Batch gesammelt. Das jetzt noch an Sephadex gebundene Cortisol und ^3H -Cortisol wird mit einem Überschuß an Nachwaschserum und anschließend mit N/10 HCl oder Puffer von der Säule eluiert und in einem zweiten Batch gesammelt. Die Säulen stehen damit für einen neuen Durchgang zur Verfügung.

2.2. Material und Reagenzien

2.2.1. Radioaktiver Arbeitsstandard

Als radioaktiver Tracer wurde Cortisol-1,2,- ^3H Code TRK 133 (Fa. Radiochemical Center, Amersham, England) verwandt. Der Tracer wurde in einem Benzol-Äthanol-Gemisch im Verhältnis 9 : 1 geliefert. Die Verdünnung des Tracers richtete sich nach der spezifischen Aktivität der verwandten Substanz, damit eine genügend hohe Countzahl pro Probe (15.000 CPM) eingesetzt werden konnte. Die spezifische Aktivität des hier verwandten Tracers lag bei ca. 55 Ci/mMol (= 152 mCi/mg).

Zur Herstellung des radioaktiven Arbeitsstandards wurden 0,25 ml (= 250 μCi) der obengenannten Substanz unter Zusatz von 20 ml Äthanol abs. in einem Erlenmeyer-Kolben mit Aqua bidest. ad 500 ml verdünnt. Es befand sich also in 100 μl eine Radioaktivität von ca. 0,05 μCi , was einer kalten Hormonmenge von ca. 0,3 ng/Ansatz entspricht.

2.2.2. Kalter Hormonstandard

Auf einer Analysenwaage wurden 50 mg Cortisol (Fa. Merck) abgewogen und anschließend in 100 ml (Äthanol abs. / Aqua bidest. 50/50) gelöst. Wir hatten jetzt eine Stammlösung mit einer Konzentration von 500 µg/ml Cortisol. 5 ml dieser Lösung verdünnten wir mit Aqua bidest. ad 250 ml und erhielten somit eine Konzentration von 10 µg/ml. Wir verdünnten jetzt 3,2 ml der 10 µg/ml-Lösung mit Aqua bidest. ad 100 ml. Diese Lösung hatte eine Konzentration von 32 µg/100 ml bzw. 32 ng/100 µl. Von dieser Konzentration ausgehend stellten wir durch Überpipettieren eine Verdünnungsreihe her mit den Konzentrationen 16 / 8 / 4 / 2 / 1 / 0,5 / 0,25 / 0,13 ng/100 µl. Die Höhe der Standardkonzentrationen für die Eichkurve war von der verwandten Cortisol-Antikörper-Lösung abhängig (Kap. 2.2.5.).

2.2.3. Nachwaschserum

Zur Herstellung des Nachwaschserums verwandten wir ein gepooltes Mischserum aus den täglich anfallenden Serumresten der Laboratorien für Klinische Chemie. Dieses Mischserum wurde mit einem 0,05 M Na-K-Phosphatpuffer (pH 8,0) im Verhältnis 1 : 3 verdünnt. Wir mischten z.B. 20 ml des Serums mit 60 ml Puffer in einem Meßzylinder. Dazu gaben wir ca. 1,0 g Florisil (Fa. Serva, Heidelberg), und schüttelten das Gemisch einigemal bei Zimmertemperatur. Durch den Zusatz von Florisil hatten wir einen großen Teil der endogenen Steroide im verdünnten Mischserum adsorbiert. Das mit Florisil ausgeschüttelte Mischserum füllten wir nun in 20 ml-Plastikgläser, zentrifugierten es bei ca. 1500 x g 15 Minuten lang und dekantierten dann das Serum vom Florisil ab.

2.2.4. Säulenpräparation

Als Säulen verwandten wir 5 ml-Einmalspritzen (Fa. Braun, Melsungen). Das untere Ende der Säule, an dem sich in der Mitte der Auslaufkonus befindet, wurde mit einem Glasfaser-Membranfilter, Ø 13 mm (Firma Sartorius, Göttingen, Nr. 13 400) abgedeckt und zwar so, daß die rauhe Seite des Filters nach oben lag. Diese Membranfilter wurden vorher für kurze Zeit in Aqua dest. eingelegt.

Für die Chromatographie verwandten wir das Dextrangel Sephadex G-10 (Fa. Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Schweden). Es wurden 2,0 g der Trockensubstanz pro Säule abgewogen und mit reichlich Aqua dest. ca. 12 Stunden gequollen. Zur Präparation der Säulen gossen wir den größten Teil des Flüssigkeitsspiegels über dem gequollenen Gel ab, schwemmen mit einem kleinen Rest Wasser das Gel auf und füllten damit die Säulen. Nach Absetzen des Gels in der Säule legten wir auf die Oberfläche einen zweiten angefeuchteten Membranfilter, diesmal mit der glatten Seite nach oben. Hatten sich nach einigen Durchgängen kleine Bläschen an der Säulenwand gebildet, z.B. durch kurzzeitiges Ansaugen von Luft im Schlauchsystem, so entfernten wir den Deckfilter und rührten unter Zusatz von wenig Wasser die Gelmatrix auf. Nachdem diese sich wieder gesetzt hatte, wurde die Geloberfläche mit einem neuen Membranfilter abgedeckt. Die Säulen standen also mit demselben Gel für weitere Durchgänge zur Verfügung.

2.2.5. Cortisol-Antikörper-Lösung

Für unsere Versuche verwandten wir - wenn nicht anders erwähnt - als Antikörper ein Kaninchen-Antiserum gegen C 21-Hemisuccinat-BSA-Konjugat des Cortisons (Universitätskinderklinik München, Dr. BIDLINGMAIER). Im weiteren Text wird dieser Antikörper als AK 1 abgekürzt, das Antiserum gegen Cortisol-21-Hemisuccinat-Rinderalbumin-Komplex (Professor VECSEI, Heidelberg) AK 2 benannt. 0,5 ml des Antiserums verdünnten wir in der Regel mit 0,05 M Na-K-Phosphat-Puffer pH 8,0 ad 500 ml, d.h. 1 : 1000. Der Puffer hatte einen Zusatz von NaN_3 3,2 g pro 10 l zum Schutz vor einer bakteriellen Zersetzung der Cortisol-Antikörper-Lösung.

Generell wurde die Verdünnung eines Antikörpers so gewählt, daß beim Leerwert ca. 70% des eingesetzten ^3H -Cortisols von der Säule eluiert wurden.

2.2.6. Testansatz

Für den Testansatz wurden mit Eppendorf-Pipetten jeweils

- 100 μl kalter Hormonstandard bzw. Serum
- 100 μl radioaktiver Standard
- 100 μl N/10 HCl

in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Die Serumproben mußten je nach Höhe des endogenen Cortisolspiegels unterschiedlich verdünnt werden, damit die Meßergebnisse im günstigen (steilen) Bereich der Eichkurve abgelesen werden konnten. In der Regel verdünnten wir die 9.00 Uhr-Nüchternwerte von Normalpersonen 1 : 10 bzw. 1 : 15, Stimulationswerte nach ACTH bzw. Seren bei einem IHT, sowie die Seren von Patienten mit Cushing-Syndrom oder von Schwangeren 1 : 30 bzw. 1 : 40. Seren nach einem Dexamethason-Hemmttest sowie Seren von Patienten mit Nebennierenrindeninsuffizienz setzten wir unverdünnt ein.

2.2.7. β -Szintillationszählung

Die Eluate wurden direkt in Zählgläschen (Plastikgefäße, $\emptyset$ 25 mm, Fa. Zinsser, Frankfurt) gesammelt und mit 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Unisolve, Fa. Zinsser, Frankfurt) versetzt. Anschließend wurden die Gefäße verschlossen und auf einem Whirlmix 15 Sekunden lang geschüttelt. Bei einer Eluatmenge ab ca. 3 ml lag eine gelförmige Phase vor.

Anschließend wurden die Proben 30 Minuten lang bei 4° C vorgekühlt, um dann bei derselben Temperatur in einem β -Szintillationszählgerät (Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer System Modell 3324, Fa. Packard, Illinois, USA) gezählt zu werden.

Einstellung des Gerätes: Gain 55%, Window 50 - 1000, time preset 1 min. Eine Quenchkorrektur der Einzelproben wurde nicht durchgeführt.

Die Aktivitäten von B (=Antikörper-gebundenes ^3H -Cortisol) und F (= freier Cortisolanteil) wurden in Prozent der jeweiligen Gesamtaktivität (B + F) angegeben. Dieses Vorgehen hatte sich als genauestes und richtigstes bewährt (6, 38). Eine an diesen Szintillationszähler angeschlossene Tele-Type ermöglichte einen direkten Ausdruck der Zählergebnisse auf Lochstreifen zur weiteren Auswertung (Kap. 2.5.).

2.3. Vorversuche zur Optimierung des Assays

2.3.1. Chromatoparttechnik - Batchtechnik

Zwei verschiedene Fraktionssammelverfahren bei der Säulenchromatographie werden im Folgenden immer wieder erwähnt:

1. Die Chromatoparttechnik: Hierbei wurden in kurzen Zeitabständen (z.B. 1, 2, oder 5 Minuten) Fraktionen bei der Chromatographie gesammelt. Man erhielt dadurch ein genaues Elutionsprofil für die jeweilige Methode. Das mit dieser Chromatoparttechnik ermittelte Elutionsprofil für die Cortisolbestimmung zeigt Abbildung 1.
2. Die Batchtechnik: Bei festgelegter Methodik ergaben sich aus dem Chromatopartversuch die Sammelzeiten für die Erfassung einer bestimmten Gesamtfraktion, z.B. das gesamte Antikörper-gebundene Cortisol (Bound $\hat{=}$ 1. Batch) (Abb.1).

2.3.2. Verkleinerung des Säulenvolumens

Für diesen Versuch hatten wir kleinere Mengen Sephadex G-10 abgewogen, gequollen und in Säulen gefüllt (Kap.2.2.4.). Wir machten diese Versuche aus Gründen der Rationalisierung, d.h. um eventuell eine Verkürzung der Chromatographiezeit, eine Verringerung der Antikörper- sowie der Sephadex-Menge zu erreichen und um damit den finanziellen Aufwand an Verbrauchsmaterialien gering zu halten. Dies erschien uns insbesondere im Hinblick auf den Einsatz dieser Methode für klinische Zwecke (hohe Probenzahl) wichtig. Leider war für uns eine wesentliche Verringerung der Sephadex-Menge nicht möglich; so erfolgte bei Einsatz von 0,8 bis 1,0 g Sephadex G-10 bereits keine Trennung von B und F auf dieser Säule, da die Adsorption von Cortisol zu gering war.

2.3.3. Verschiedene Gele bzw. Adsorbentien

Um die Adsorption von Cortisol zu verstärken, d.h. um die spontane Elution des Cortisols durch den Puffer zu verhindern und somit das Tal zwischen den beiden Peaks (Kap.2.3.1., Abb. 1) mehr der Nulllinie anzunähern, machten wir Versuche mit 5 ml-Säulen aus Florisil (2,2 g) und mit 5 ml-Säulen aus einem Gemisch von Sephadex G-10 und Florisil in den Verhältnissen 1 : 3 und 1 : 1.

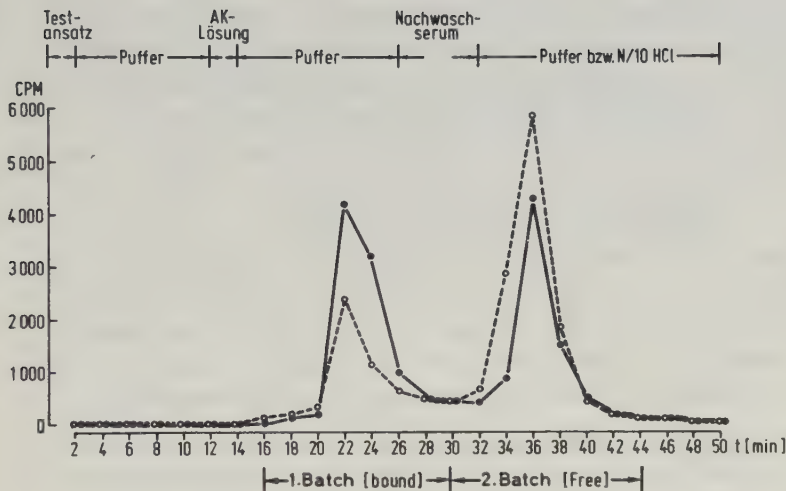


Abb. 1: Elutionsprofil für die radioimmunologische Cortisol-Bestimmung auf Sephadex G-10.

Testansatz 1 : |-----|

100 µl kalter Hormonstandard (1 ng)
100 µl radioaktiver Tracer
100 µl N/10 HCl

Testansatz 2 : |-----|

100 µl Leerwert
100 µl radioaktiver Tracer
100 µl N/10 HCl

Säule : 2 g Sephadex G-10

Puffer : Na-K-Phosphatpuffer 0,05 M, pH 8,0

Pumpgeschwindigkeit :

0,25 ml/min

t = 26 °C

Am oberen Rand der Abbildung sind Zeitpunkt und Dauer des Auftragens der einzelnen Substanzen auf die Säule dargestellt. Die aus diesem Versuch zu entnehmende zeitliche Verschiebung zwischen dem Ansaugen der Cortisol-Antikörper-Lösung und dem Auftreten des ersten Peaks ist mit der Wegstrecke von den Ansaugnadeln über das Schlauchsystem der Pumpe zu den Säulen zu erklären. Das Tal zwischen dem ersten und dem zweiten Peak fällt nicht mit der Null-Linie zusammen, da das auf dem Gel retinierte Cortisol in geringem Maß mit dem Puffer von der Säule spontan eluiert wird (11, 38).

Alle diese Versuche brachten jedoch dasselbe Ergebnis: Die reinen Florisil-Säulen, ebenso wie die Sephadex G-10 / Florisil-Säulen, gleich in welchem Mischungsverhältnis, zeigten eine so starke Adsorption von Cortisol, daß mit der Cortisol-Antikörper-Lösung (Kap. 2.2.5.) keine ausreichende Bindung von Cortisol bzw. ^3H -Cortisol und damit Elution von der Säule zu erzielen war.

2.3.4. pH-Wert und Molarität des Puffers

Wir untersuchten Na-K-Phosphatpuffer pH 6,0, 7,2, 8,0 und 9,0 jeweils 0,05 M. Mit jedem der Puffer erstellten wir eine Eichkurve und es ergab sich eine zunehmende Steilheit bei Verschiebung des Puffer-pH ins Alkalische (Abb.2). Zwischen Puffer-pH 8,0 und 9,0 war jedoch kein wesentlicher Unterschied festzustellen.

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen der Molarität des Elutionsmittels, d.h. des Na-K-Phosphatpuffers und der Steilheit der Eichkurve festzustellen, untersuchten wir den Na-K-Phosphatpuffer pH 8,0, mit einer Molarität zwischen 0,05 und 0,5 (Abb.3). Eine Molarität kleiner 0,05 reichte nicht zur Neutralisierung der zur Extraktion des Serums auf der Säule verwandten 0,1 N HCl aus.

Mit steigender Molarität nahm die Steilheit der Eichkurve ab (z.B. 0,1 M, Abb. 3). Bei weiterer Steigerung der Molarität verschlechterte sich die Affinität des Sephadex G-10 zum ^3H -Cortisol, ersichtlich aus den deutlich höheren %F-Werten bei den Nullwerten (z.B. 0,5 M, Abb. 3).

Aufgrund dieser Ergebnisse verwandten wir bei den folgenden Versuchen Na-K-Phosphatpuffer 0,05 M, pH 8,0.

2.3.5. Pumpgeschwindigkeit

Es besteht eine Abhängigkeit zwischen der Adsorption von Cortisol an das Gel und der Elutionsgeschwindigkeit.

Wir versuchten, unsere anfängliche Elutionsgeschwindigkeit von 0,25 ml/min aus Gründen der Rationalisierung auf 0,5 ml/min zu erhöhen. Bei diesem Chromatopartversuch erhielten wir nur einen einzigen breiten Peak, d.h. keine Trennung zwischen freiem und gebundenem Cortisol. Dies war mit der zu geringen Adsorption von ^3H -Cortisol an die Säule zu erklären. Die spontane Elution von

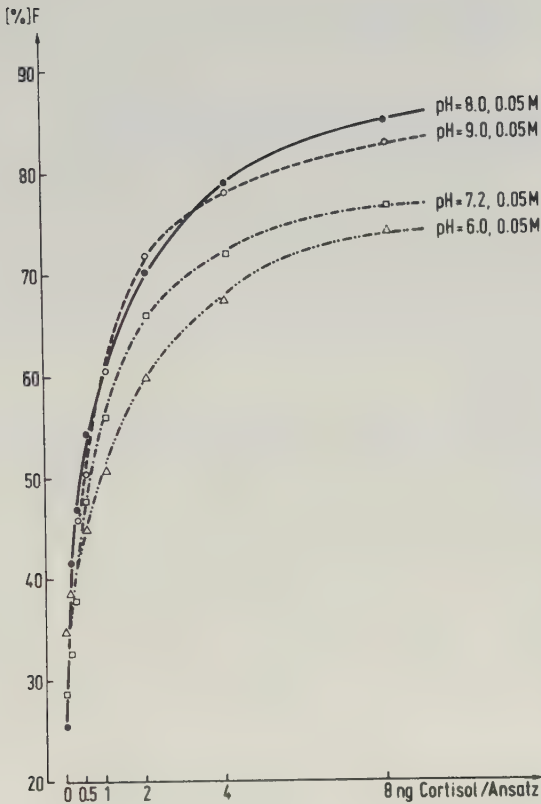


Abb. 2: Vergleich von Standard-Eichkurven bei verschiedenen pH-Werten des Elutionspuffers.

Dargestellt sind 4 Standard-Eichkurven für Cortisol bei unterschiedlichem pH-Wert des Elutionsmittels, nämlich Na-K-Phosphatpuffer pH 6,0, 7,2, 8,0, 9,0, aber gleicher Molarität (0,05 M).

Abszisse: ng Cortisol / Ansatz

Ordinate: %F (= freier Cortisolanteil)

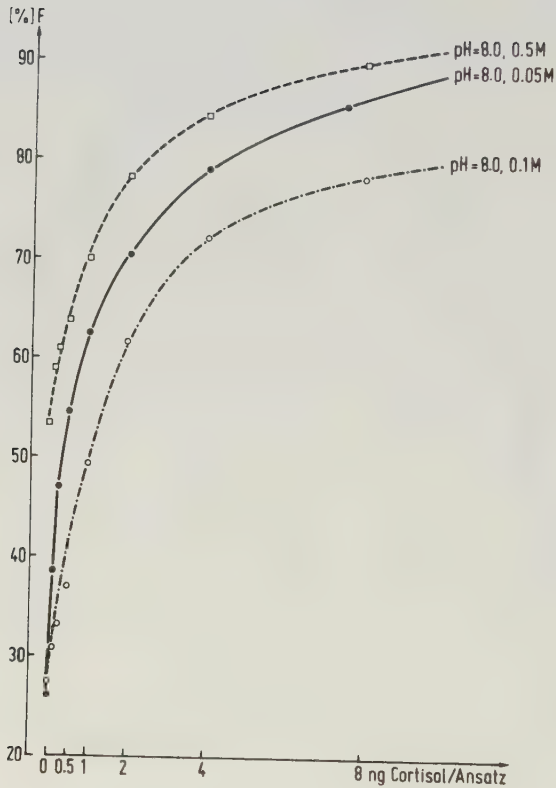


Abb. 3: Vergleich von Standard-Eichkurven bei unterschiedlicher Molarität des Elutionspuffers.

Dargestellt sind 3 Standard-Eichkurven für Cortisol bei unterschiedlicher Molarität des Elutionsmittels (Na-K-Phosphatpuffer 0,1, 0,5, 0,05 M), aber gleichem pH-Wert (pH 8,0).

Abszisse: ng Cortisol / Ansatz

Ordinate: %F (= freier Cortisolanteil)

^3H -Cortisol setzte bei dieser Geschwindigkeit ($v = 0,5 \text{ ml/min}$) bereits nach 8 Minuten, also noch vor Beendigung des Umpufferungsschrittes ein.

2.3.6. Testung verschiedener Plasmaexpander als Ersatz für das Nachwaschserum

Um das umständliche Vorbereiten des Nachwaschserums zu vermeiden und vor allem, um die bei sauberem Arbeiten jedoch geringe Hepatitisgefahr für die Laborantin auszuschalten, versuchten wir, angeregt durch die Verwendung von Periston^R-N bei der radioimmunologischen T_4 -Bestimmung (19), das Nachwaschserum durch Plasmaexpander zu ersetzen.

Wir untersuchten die Substanzen Haemaccel^R (Behringwerke AG, Marburg), Macrodex^R (Knoll AG, Ludwigshafen), Rheomacrodex^R (Knoll AG, Ludwigshafen) und Periston^R-N (Bayer AG., Leverkusen). Bei der Testung der genannten Substanzen erhielten wir im Chromatopartversuch folgendes Ergebnis: Mit den Plasmaersatzmitteln wurden, selbst durch stundenlanges Spülen, jeweils nur bis zu 70% des erwarteten Anteils an freiem Cortisol von der Säule eluiert. Der auf der Säule verbliebene Rest (= 30%) konnte nur durch Auftragen von Nachwaschserum eluiert werden. Keine der untersuchten Substanzen wies ein deutlich unterschiedliches Reaktionsverhalten auf.

2.3.7. Schlußfolgerungen aus den Vorversuchen

Da eine Verkleinerung des Säulenvolumens nicht möglich war, arbeiteten wir bei den folgenden Versuchen mit 5 ml-Sephadex G-10-Säulen (= 2 g). Wir verwandten auf Grund der Ergebnisse aus den Vorversuchen Na-K-Phosphatpuffer 0,05 M, pH 8,0 mit einem Zusatz von NaN_3 3,2 g pro 10 l. Die Pumpgeschwindigkeit bei unseren Durchgängen betrug 0,25 ml/min.

Zur Elution des freien Cortisolanteils verwandten wir speziell zubereitetes Nachwaschserum (Kap.2.2.3.).

2.4. Mechanisierung

2.4.1. Apparatur für den mechanisierten Cortisol-RIA

Zur Durchführung des Assays stand uns die in Abbildung 4 gezeigte Apparatur zur Verfügung. Die Mechanisierung beruhte auf der von HORN und Mitarbeitern erarbeiteten Automatisierung für den T_3 -in vitro-Test und der Gesamt- T_4 -Bestimmung (19, 20, 21) nach dem Prinzip der simultanen Säulenchromatographie.

Bei diesem Apparat wurden der Testansatz, die Antikörper-Lösung, das Nachwaschserum und der Puffer zeitgesteuert auf die Säule aufgetragen. Die beiden Fraktionen (Antikörper-gebundene und freie) wurden durch eine automatische Zeitsteuerung in Plastikgefäßen gesammelt. Die Uhreneinstellung für die Zeitsteuerung richtete sich nach den im Chromatopartversuch gewonnenen Sammelzeiten für die einzelnen Gesamtfaktionen (Abb. 1). Bis zur 16. Minute verwarfen wir das Eluat, von der 16. bis 30. Minute sammelten wir den Antikörper-gebundenen Cortisolanteil (= Bound = B = 1. Peak), von der 30. bis 44. Minute den freien Cortisolanteil (= Free = F = 2. Peak). Über eine 25-canal-micro-pump (C) wurde aus dem Gefäß (B) der Testansatz auf die angesäuerten Säulen (pH = 1,0) (D) gepumpt, die von einem Thermoblock (H) $t = 26^{\circ} \text{C}$ umschlossen waren. Nach dem Auftragen des Testansatzes (1,2 Minuten) wurden die Säulen 10 Minuten lang mit Na-K-Phosphatpuffer 0,05 M, pH 8,0 umgepuffert, bevor die Antikörper-Lösung ($500 \mu\text{l} \approx 2$ Minuten) auf die Säule gelangte. Hinterher spülten wir wieder 12 Minuten lang mit Puffer, eluierten dann mit Nachwaschserum (6 Minuten) den freien Cortisolanteil von der Säule. Anschließend wurde von der 32. bis 44. Minute Na-K-Phosphatpuffer bzw. N/10 HCl auf die Säule aufgetragen. Batch I wurde in Gefäß I, Batch II in Gefäß II aufgefangen (Abb.4).

2.4.2. "Sartorius-Membranfilter-Gerät"

Wir versuchten, vom Halbautomaten mit lediglich automatisch gesteuertem Auslauf (Abb.4) auf den Prototypen des Vollautomaten der Fa. Sartorius, Göttingen, überzuwechseln, der bereits für die radioimmunologische Gesamt- T_4 -Bestimmung sowie für den T_3 -in vitro-Test zur Verfügung stand.

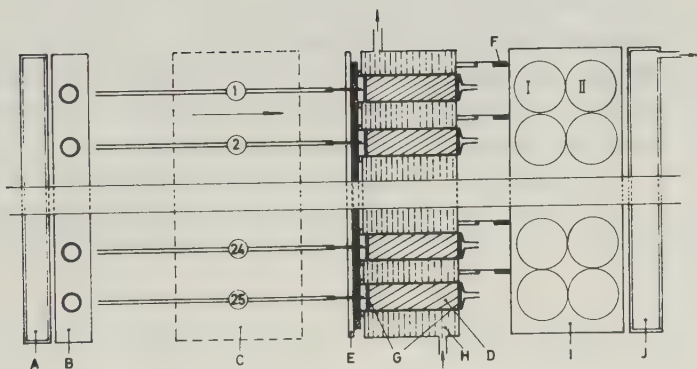
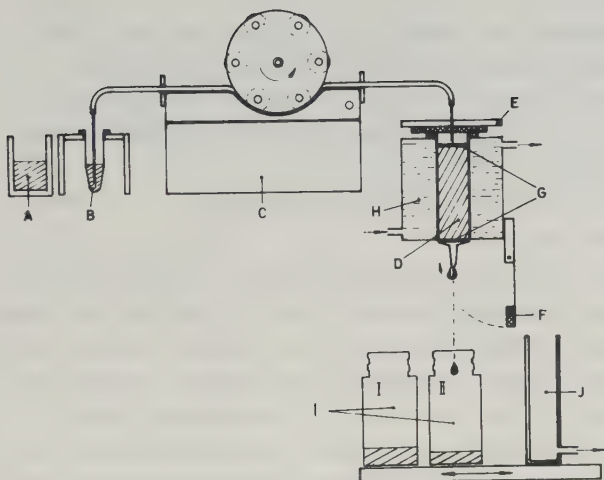


Abb. 4: Schematische Darstellung der Apparatur für den mechanisierten Cortisol-RIA (simultane Säulenchromatographie)

a) Längsschnitt

b) Aufblick

Erklärung siehe Text

A = Puffervorratsgefäß
B = Gefäß für den Testansatz
C = 25-canal-micro-pump
D = Dextrangelsäule
E = obere Deckplatte

F = Verschluss für die Ausflußöffnung
G = Membranfilter
H = Thermoblock
I = Sammelgefäße (I, II)
J = Gefäß für den Vorlauf

Bei diesem Vollautomaten war sowohl der Einlauf wie auch der Auslauf (Probenwechsler) durch Uhreneinstellung automatisch gesteuert. Während ein Durchgang lief, konnte man bereits den nächsten vorbereiten bzw. den vorhergehenden weiter aufbereiten (zählen etc.).

Bei unserem Versuch einer Automatisierung stellten sich jedoch folgende Schwierigkeiten ein:

1. Hauptproblem war für uns von Anfang an der Zentralverschluß. Er konnte nie so festgeschraubt werden, daß er alle Säulen gleichmäßig abdichtete. Deshalb erhielten wir auf einigen Säulen Überstände, andere Säulen liefen sogar über. Auf wieder anderen Säulen war der Druck jedoch so groß, daß das Gel nach unten herausgedrückt wurde. Beweisend dafür, daß es nur am Zentralverschluß liegen konnte, war die Tatsache, daß diese Schwierigkeiten stets an derselben Stelle im Säulenblock auftraten. Das Problem konnte am Prototyp nur unzureichend gebessert werden.

2. Ein weiteres Problem am Automaten waren für uns die Säulen. Wir mußten handgedrehte 5 ml-Spritzen der Fa. Sartorius, Göttingen, verwenden; diese hatten gegenüber den von uns verwandten Plastikspritzen der Fa. Braun, Melsungen, folgende Nachteile:

- a) Bei den Sartorius-Spritzen sammelten sich die einzelnen Tropfen am unteren Ende der Säule, d.h. sie tropften nicht gleichmäßig. Grund hierfür war der viel zu kurze Konus der Spritzen.
- b) Die Sartorius-Spritzen hatten keinerlei Markierung, so daß man die genaue Füllhöhe der Säulen nur ungefähr abschätzen konnte.
- c) Die Plastiksubstanz, aus der die Sartorius-Spritzen hergestellt wurden, war außerordentlich dick und milchig; man konnte deshalb kaum die Qualität der Säulen überprüfen, was aber nach einigen Durchgängen unbedingt erforderlich war.
- d) Außerdem hatten wir für unseren Säulenblock keinen geeigneten unteren Zentralverschluß, so daß wir die Säulen sofort nach Beendigung des Versuchs aus dem Block herausnehmen mußten, um so zu verhindern, daß sie trockenliefen.

3. Ein anderes Problem waren die Uhren für die automatische Steuerung. Nach jedem Durchgang liefen die Uhren um einige Sekunden langsamer (10 - 15 Sekunden), ohne daß sich dabei an der anfänglichen Zeigerstellung etwas veränderte. Nach mehreren Durchgängen belief sich dann die Zeitdifferenz auf eine Minute und mehr. Es war uns also unmöglich, für jeden Durchgang genau gleiche Zeiten zu gewährleisten.

4. Die automatische Steuerung dieses Prototypen wies erhebliche Mängel auf. Der Arm mit den Ansaugnadeln mußte des Öfteren per Hand von einem Vorratsgefäß ins nächste befördert werden. Es geschah auch, daß er über einem Vorratsgefäß stehenblieb bzw. zwischen zwei Gefäßen niederging.

Wir erhielten an diesem Automaten eine Wiederfindung von $82,7 \pm 11,3 \%$ ($\bar{x} \pm s$). Für die Genauigkeit in der Serie (Kap. 3.1.1.) errechneten wir im mittleren Bereich einen Variationskoeffizienten von 24,9%, bei einem Mittelwert von $11,5 \pm 2,9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$, $N = 25$), bzw. im selben Bereich einen VK von 39,1%, bei einem Mittelwert von $9,0 \pm 3,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$, $N = 25$).

Für die Genauigkeit von Tag zu Tag (Kap.3.1.1.2.) bestimmten wir einen Variationskoeffizienten von 32,7%; der Mittelwert lag hier bei $12,9 \pm 4,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$, $N = 28$).

Abschließend muß festgehalten werden, daß dieser Prototyp der Fa. Sartorius, Göttingen, zwar einige prinzipielle Verbesserungen der Automatisierung mit sich bringt (zeitliche Steuerung von Einlauf und Auslauf), die technischen Mängel insbesondere am Thermoblock allerdings so erheblich waren, daß darunter die Genauigkeit der Methode litt. An der maschinellen Verbesserung wird angeblich zwischenzeitlich gearbeitet.

2.5. Eichkurve und Auswertung der Zählergebnisse

Die Auswertung erfolgte mit einer Datenverarbeitungsanlage Siemens 404/3 und eines HAGEN-Graphomaten nach einem FORTRAN-Programm auf der Grundlage der Spline Approximation (34, 48). Die Eichkurve und die Standardabweichungen wurden in einem halblogarithmischen Koordinatensystem dargestellt. Durch ein spezielles Glättungsprogramm konnten falsche Meßwerte eliminiert werden. Eine typische - so erstellte - Eichkurve zeigt Abbildung 5. Der Bereich der Eichkurve wurde

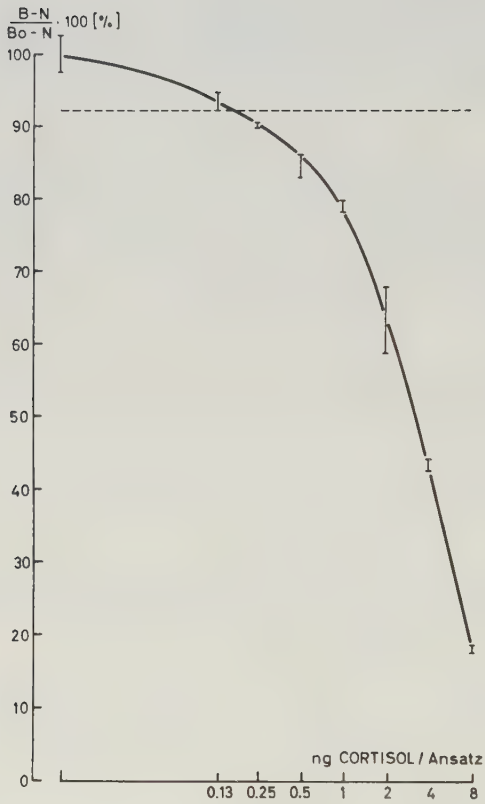


Abb. 5: Cortisol-Standardkurve.

Ausgewertet mittels einer Datenverarbeitungsanlage Siemens 404/3 und eines HAGEN-Graphomaten nach einem FORTRAM-Programm auf der Grundlage der Spline Approximation.

Abszisse: ng Cortisol / Ansatz

Ordinate: $\frac{B-N}{B_0-N} \cdot 100\%$

so gewählt, daß der steile Abschnitt zwischen 0,2 bis 2,0 ng Cortisol pro Ansatz (= 100 µl) liegt, was 0,2 bis 2,0 µg/100 ml Cortisol entspricht.

Eine größere Empfindlichkeit, d.h. eine kleinere untere Nachweisgrenze, hätte sich durch Änderungen der Versuchsbedingungen (Antikörperverdünnung, Temperatur usw.) erzielen lassen, war aber für den Gebrauch dieser Methode für Messungen von menschlichen Cortisolserumspiegeln nicht erforderlich.

2.6. Versuche zur radioimmunologischen Bestimmung des freien Cortisols im Urin

Die Hormone der Nebennierenrinde Cortisol, Corticosteron und Aldosteron erscheinen in kleiner Menge unverändert im Urin, neben einer großen Anzahl von Metaboliten dieser Hormone. Den bisher bekannten Methoden zur Bestimmung von Cortisol im Urin gehen zum Teil aufwendige Extraktionsschritte voraus (8, 13, 14, 17, 57, 59). Wir versuchten deshalb das Methodenprinzip der radioimmunologischen Bestimmung von Cortisol im Serum, ohne vorherige Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und ohne Inkubation auch für eine radioimmunologische Cortisolbestimmung im Urin anwendbar zu machen. Unser Ziel war die parallele Messung von Cortisol im Serum und im Urin mit derselben Methode. Die Messung der Ausscheidungsrate an freiem Cortisol wäre gleichermaßen ein Bilanztest der Nebennierenrindensekretion, während die Plasmacortisolbestimmung praktisch eine "Momentaufnahme" darstellt.

Für den Testansatz der folgenden Versuche pipettierten wir

100 µl verdünnten bzw. unverdünnten Urin (24-Stunden-Urin
bzw. fraktionierte Urinproben)

100 µl radioaktiven Standard

in Eppendorf-Reaktionsgefäße.

Da Cortisol im Urin in freier Form, d.h. nicht Protein-gebunden vorliegt, entfiel die Ansäuerung des Testansatzes und der Säulen (Kap.2.1.) mit dem Ziel einer Zerstörung der Proteinbindung. Dadurch verkürzte sich die Chromatographiezeit, da der Umpufferungsschritt zwischen dem Auftragen des Testansatzes und des Antikörpers entfiel.

Der mit Hilfe der Batch-Technik (Kap.2.3.1.) ermittelte zeitliche Ablauf der Chromatographie sah folgendermaßen aus:

- 0 - 1 min Testansatz
- 1 - 3 min Antikörper (AK 1 bzw. AK 2)
- 3 - 15 min Na-K-Phosphatpuffer 0,05 M, pH 8,0
- 15 - 21 min Nachwaschserum
- 21 - 26 min Na-K-Phosphatpuffer 0,05 M, pH 8,0

Die bei diesem Versuch ermittelten Cortisolkonzentrationen im 24-Stunden-Urin lagen zwischen 800 - 1000 µg Cortisol / 24-Stunden-Urin. Verglichen mit einer kompetitiven Proteinbindungsanalyse nach Dichlormethanextraktion (62) erhielten wir also ohne Extraktion zehnfach höhere Werte.

	RIA ohne Extraktion (AK 2)	CPBA nach Dichlor- methanextraktion	
Urin ₁	960,0	91,0	µg Cortisol /
			24 Stunden
Urin ₂	774,0	75,0	

Unsere Ergebnisse waren zu vergleichen mit denen von K.A.DECK et al. (15). Diese führten RIA-Bestimmungen des freien Cortisols im 24-Stunden-Urin u.a. von Patienten mit Cushing-Syndrom durch und zwar aus verdünnten unextrahierten, sowie aus Dichlormethan-extrahierten bzw. extrahierten und zusätzlich dünnschichtchromatographierten Proben. Die Werte der extrahierten und zusätzlich dünnschichtchromatographierten Proben lagen um ca. 86% niedriger als die nur extrahierten Proben und um etwa das 6-fache niedriger als die nur verdünnten unextrahierten Urine. Es wurde angenommen, daß in extrahierten Urinproben eine Reaktion anderer freier Steroide mit dem Antikörper erfolgt, während im unextrahierten Urin eine Mitreaktion konjugierter Steroide stattfindet.

Nach diesen enttäuschenden Ergebnissen mußten wir auf eine vorherige Extraktion zurückgreifen, z.B. mit Äthanol und mit Dichlormethan. Äthanol: 1 ml Urin wurde mit 10 ml Äthanol ungefähr 15 min auf dem Whirlmix extrahiert; anschließend verdünnten wir 100 µl aus der Äthanolphase mit Aqua dest. ad 5,0 ml (1 : 50). Aus dieser Verdünnung setzten wir dann 100 µl in unseren Testansatz ein. Dieser Versuch brachte dieselben falsch hohen Urincortisol-Konzentrationen im Vergleich zur CPBA, wie ohne Extraktion (s.o.).

	RIA nach Äthanol- extraktion (Ak 2)	CPBA nach Dichlor- methanextraktion	
Urin ₁	1050,0	91,0	µg Cortisol /
Urin ₂	731,0	75,0	24 Stunden

Eine Extraktion mit Dichlormethan (8, 59) und anschließender Chromatographie brachte zwar wesentlich niedrigere Cortisol-Konzentrationen, die Ergebnisse der mit Dichlormethan extrahierten 24-Stunden-Urine lagen aber immer noch im Mittel 2,7-fach höher als die entsprechenden Proben bei Bestimmung mit einer CPBA. Bei diesem Versuch verwandten wir AK 1 (Kap.2.2.5.), der eine etwas geringere Spezifität aufweist als AK 2 (Kap.3.2.1.).

	RIA nach Dichlormethan- extraktion (AK 1)	CPBA nach Dichlor- methanextraktion	
Urin ₁	276,3	104,8	
Urin ₂	310,7	103,8	µg Cortisol/
Urin ₃	129,5	48,0	24 Stunden
Urin ₄	107,2	44,8	

Es ist also - nach den Ergebnissen im Serum (Kap. 3.2.) - erstaunlich, festzuhalten, daß wir bei Einsatz des uns zur Verfügung stehenden Antiserums gegen C 21-Hemisuccinat-BSA-Konjugat des Cortisons (AK 1) höhere Cortisolkonzentrationen im Urin erhielten, als bei Verwendung eines Transcortin-reichen Serums (22, 26, 39). Diese Tatsache können wir uns nur durch den Spezifitätsunterschied der beiden bindenden Proteine für die im Urin zahlreich vorhandenen Gluco- und Mineralo- sowie Androgen-Metaboliten erklären (60). Im Gegensatz zum Serum ist das Transcortin-reiche Serum im Urin wesentlich spezifischer als der Antikörper. Wir mußten annehmen, daß der Cortisol-AK im Urin auch mit Cortisol-Abbauprodukten reagiert, während das CBG-Serum hier relativ spezifischer ist, d.h. die Metaboliten entscheidend weniger mit ins Meßergebnis eingehen, ohne daß bisher im Einzelnen untersucht worden ist, um welche Metaboliten es sich dabei handelt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Qualitätskontrolle

3.1.1. Präzision

Die Präzision einer Methode beschreibt man durch den Variationskoeffizienten innerhalb einer Testserie (= Intraassay-Variationskoeffizient) und zwischen verschiedenen Testserien (= Interassay-Variationskoeffizient). Der Variationskoeffizient ist definiert als Standardabweichung in Prozent des Mittelwertes.

3.1.1.1. Intraassay-Variationskoeffizient

Wir ermittelten den Intraassay-Variationskoeffizienten, indem wir in einem Assay dasselbe Normalserum aus einer Verdünnung heraus bestimmten. Dabei fanden wir für unsere Methode einen Variationskoeffizienten

a) Im mittleren Bereich:

VK = 7,8 %; der Mittelwert lag hier bei $11,2 \pm 0,9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$), wobei der niedrigste Wert bei $10,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, der höchste bei $13,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol lag (N = 25).

b) Im Bereich niedriger Konzentrationen (Serum nach Dexamethasongabe) :

VK = 21,7 %; der Mittelwert betrug $0,40 \pm 0,09 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$). Der höchste Wert lag bei $0,60 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, der niedrigste bei $0,30 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol.

3.1.1.2. Interassay-Variationskoeffizient

Die Genauigkeit von Tag zu Tag (Interassay-VK) prüften wir durch Bestimmung desselben Normalserums in der Verdünnung 1 : 10 über mehrere Wochen. Dabei ermittelten wir für unsere Methode einen VK von 9,1% und einen Mittelwert von $11,4 \pm 1,04 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$). Die Werte lagen zwischen $10,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ und $13,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol (N = 40).

3.1.2. Richtigkeit (Wiederfindung)

Wir bestimmten hierfür den Cortisolgehalt eines Serums nach einem Dexamethason-Hemmtest in der Verdünnung 1 : 10 (= Leerwert). Einen Teil dieses Serums verdünnten wir 1 : 5 und pipettierten es zusammen mit einem kalten Cortisolstandard, z.B. 8 ng/Ansatz in Gefäß I. In andere Gefäße wurde eine bestimmte Menge, z.B. 1 ml des 1 : 10 verdünnten Dexaserums vorpipettiert und ausgehend von Gefäß I durch Überpipettieren jeweils 1 ml dazugegeben. Wir erhielten für unseren Cortisol-RIA im Bereich von 4 - 0,13 ng eine Wiederfindenquote von $95,8 \pm 7,3 \%$ ($\bar{x} \pm s$), N = 9.

3.2. Untersuchungen zur Spezifität des Cortisol-RIA

3.2.1. Endogene Steroide

Zur Spezifitätsüberprüfung (Versuche mit J.BRAUN) setzten wir kalte Hormonstandards von Cortison, 11-Desoxycortisol, Corticosteron, 17 α -Hydroxyprogesteron, Progesteron, Östradiol, Testosteron (Liste der Präparate) anstelle eines Cortisolstandards im Assay ein und lasen ihre Verdrängung an der Cortisol-Eichkurve ab.

Die Mitreaktionen der einzelnen endogenen Steroide wurden in Prozent der Cortisolreaktion angegeben. Abbildung 6 zeigt die Mitreaktionen für diesen RIA, einmal mit AK 1 (Kap.2.2.5.) und zum anderen mit AK 2 (38). Außerdem wurde die Spezifität der CPBA nach diesem Methodenprinzip (6) noch einmal mit angegeben.

Es ergab sich bei allen untersuchten Steroiden eine deutliche Spezifitätssteigerung der radioimmunologischen Bestimmung gegenüber der CPBA. Der AK 2 war gegenüber dem AK 1 noch etwas spezifischer.

3.2.2. Therapeutisch eingesetzte Substanzen als Störfaktoren

Es wurden wie oben Standards der Substanzen Prednison, Betamethason, Prednisolon, Dexamethason, 9 α -Fluorhydrocortison, Fludrocortison, Methylprednisolon, Triamcinolon, Spironolacton und Carbenoxolon hergestellt (Liste der Präparate) und im Assay eingesetzt. Aus der Abbildung 7 ist die zum Teil nicht unerhebliche Mitreaktion der einzelnen Substanzen ersichtlich. Es ist also, auch beim Cortisol-RIA

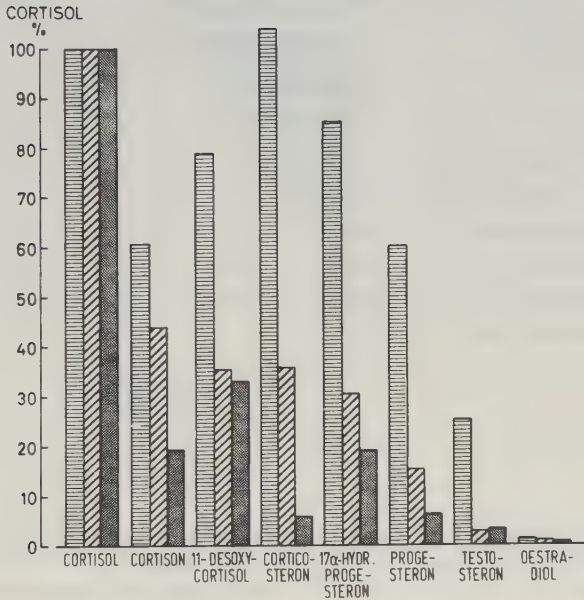


Abb. 6: Spezifitätsuntersuchungen (endogene Steroide).

Eingezeichnet sind die Mitreaktionen verschiedener endogener Steroide in Prozent der Cortisolreaktion.

Mechanisierter RIA (Antikörper 2) = rechte Säule
Mechanisierter RIA (Antikörper 1) = mittlere Säule
Competitive Proteinbindungsanalyse = linke Säule

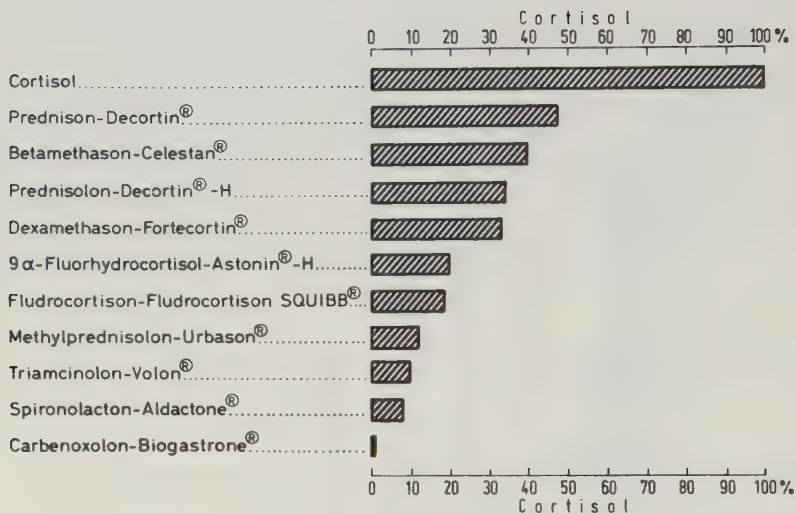


Abb. 7: Spezifitätsuntersuchungen (therapeutisch eingesetzte Corticoide, Spironolacton, Carbenoxolon).

Darstellung der Mitreaktion therapeutisch eingesetzter Substanzen, angegeben in % der Cortisolreaktion.

unbedingt erforderlich, daß Dosis und Zeitdauer der Einnahme dieser Medikamente vor der Blutentnahme für eine richtige Beurteilung bekannt sind.

MATTINGLY et al. (35) beschrieben einen Anstieg des Plasma 11-Hydroxy-Corticosteroidspiegels bei Patienten ohne Nebennierenrindeninsuffizienz unter oraler Carbenoxolongabe (Biogastrone^R, Homburg, Frankfurt). Sie nahmen an, daß Carbenoxolon direkt an der Nebennierenrinde angreift und eine vermehrte Produktion von Corticosteroiden verursacht. Diese Beobachtung geht auf Ergebnisse von KHAN und SULLIVAN (27) zurück, die anhand von Tierversuchen feststellten, daß dieser

Carbenoxolon-Effekt nach beidseitiger Entfernung der Nebennieren stark vermindert ist, nicht jedoch nach Hypophysektomie. Unsere Versuche schließen eine wesentliche Mitreaktion von Carbenoxolon im Cortisol-Radioimmunoassay aus.

Nachdem eine gewisse Mitreaktion von Spironolacton im RIA gefunden wurde (Abb.7), untersuchten wir Seren von 13 Patienten, die seit längerer Zeit unter einer hochdosierten Aldactone-Therapie (400 - 800 mg/die i.v.) standen. Mit der modifizierten fluorimetrischen Methode nach SPENCER-PEET (56) konnten diese Seren bisher wegen der starken Fluoreszenz der Substanz nicht gemessen werden (25, 33, 37, 46, 47, 52, 53, 66). Die radioimmunologischen Meßwerte lagen bei diesen Patienten mit Werten zwischen 2,6 und 22,2 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol durchaus im Größenbereich unseres Normalbereiches mit Werten zwischen 4,0 - 19,7 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol. Daraus war zu schließen, daß Aldactone keinen wesentlichen Störfaktor darstellt.

3.3. Kapazität

Mit der beschriebenen Mechanisierung konnten wir 25 Einzelwerte bzw. 12 Seren mit Doppelwerten pro Assay bestimmen. Es ließen sich ohne weiteres fünf bis sechs Durchgänge hintereinander an einem Tag ausführen, d.h. 60 bis 80 Seren mit Doppelwerten.

3.4. Normalwerte

3.4.1. 9.00 Uhr-Nüchternwerte

Ohne besondere Belastungen variiert die Plasmacortisol-Konzentration beim Gesunden innerhalb bestimmter Grenzen in einer festgelegten Tagesrhythmik. Die Cortisolkonzentration ist direkt von der Plasmakonzentration des Corticotropins (ACTH) abhängig. Der Plasmagehalt von ACTH unterliegt also ebenfalls tageszeitlichen Schwankungen, wobei die höchste Konzentration morgens zwischen 6.00 und 9.00 Uhr zu erwarten ist. Parallel dazu steigt um diese Zeit auch der Plasmaspiegel von Cortisol und fällt mit der Plasmakonzentration von ACTH kontinuierlich ab, bis ungefähr gegen Mitternacht ein Tiefpunkt erreicht ist.

Die Elutentnahmen für unser Normalkollektiv erfolgten deshalb zu einem festgesetzten Zeitpunkt (9.00 Uhr). Wir bestimmten den Cortisolspiegel in Seren von stoffwechselgesundem Klinikpersonal und nicht endokrin erkrankten Patienten. Die Werte lagen im Bereich zwischen 4,1 - 21,9 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol. Wir errechneten einen Mittelwert von $9,6 \pm 3,9$ $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$), was einem Bereich von 1,8 - 17,4 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm 2s$) entspräche. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, ergibt die Verteilung der linearen Einzelwerte keine Normalverteilung. Bei Auftragung der logarithmierten Werte findet man eine Gauß'sche Verteilungskurve und diese entspricht damit einer Normalverteilung. Nach Delogarithmierung liegen die Werte in einem Bereich zwischen 4,0 - 19,7 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm 2s$), $\bar{x} = 8,9$ $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol.

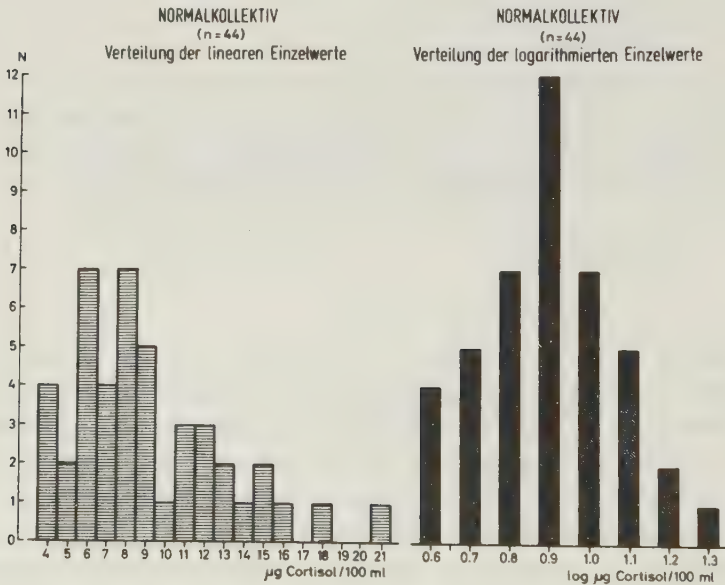


Abb. 8: Graphische Darstellung der Verteilung der linearen bzw. logarithmierten Einzelwerte des Normalkollektivs (N = 44).

3.4.2. ACTH-Belastungstest bei endokrin gesunden Patienten und Klinikpersonal

Wir führten bei zehn endokrin gesunden Patienten einen ACTH-Kurztest durch (4, 29, 36, 63, 65), d.h. mit Blutentnahmen nach 0, 30 und 60 Minuten. Mit diesem Versuch wollten wir sehen, ob der ACTH-Test zusammen mit anderen Kurztesten, wie z.B. TRH-Test, also mit Blutentnahmen 30 Minuten nach Injektion der jeweiligen Substanz durchführbar ist. Daher untersuchten wir bei diesen zehn endokrin gesunden Patienten nach Entnahme des Nüchternwertes und i.v.-Gabe von 0,25 mg Synacthen die 30- und 60-Minutenwerte nach Injektion. Bei weiteren 14 Personen ohne endokrinologische Erkrankung bestimmten wir die Nüchternwerte und die Cortisolspiegel 60 Minuten nach Synacthen (Tab.1).

Die Nüchternwerte des Gesamtkollektivs ($N = 23$) lagen im Bereich zwischen 4,4 - 28,0 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol. Es errechnete sich ein Mittelwert von $10,2 \pm 5,6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$). Die 30-Minutenwerte des Kollektivs ($N = 10$) lagen in einem Bereich zwischen 14,1 - 31,8 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol, bei einem Mittelwert von $23,2 \pm 5,8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol. Für die 60-Minutenwerte ($N = 23$) errechneten wir das Mittel zu $33,3 \pm 8,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol; der niedrigste Wert lag hier bei 18,4 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol, der höchste bei 58,2 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol.

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, läßt sich bei einer Blutentnahme 60 Minuten nach Synacthen kein erheblich höherer Cortisolanstieg erfassen, so daß eine Bestimmung 30 Minuten nach ACTH zu vertreten ist.

Tab. 1

Patient	B l u t e n t n a h m e		
	O' (N=23)	30' (N=10)	60' (N=23)
L.	28,0		58,2
Ke.	9,8		49,2
Ka.	13,8		22,8
H.	6,6		31,6
Gr.	5,4		28,8
V.	9,6		47,6
A.	6,0		34,4
Wö.	9,4		18,4
B.	8,1		31,2
E.	6,4		43,2
Kn.	10,8		36,0
Sto.	8,0		43,6
Sa.	4,7		29,7
Gn.	11,8	26,7	32,8
R.	12,3	26,4	22,8
We.	6,0	17,1	25,6
Si.	15,6	31,8	32,8
M.	8,9	24,6	35,2
D.	4,4	14,1	24,4
R.	9,9	17,7	30,4
Stä.	11,7	21,0	24,4
Wa.	21,9	30,0	33,2
P.	6,3	22,2	30,0
$\bar{x} \pm s$	10,2 $\pm$ 5,6	23,2 $\pm$ 5,8	33,3 $\pm$ 8,2

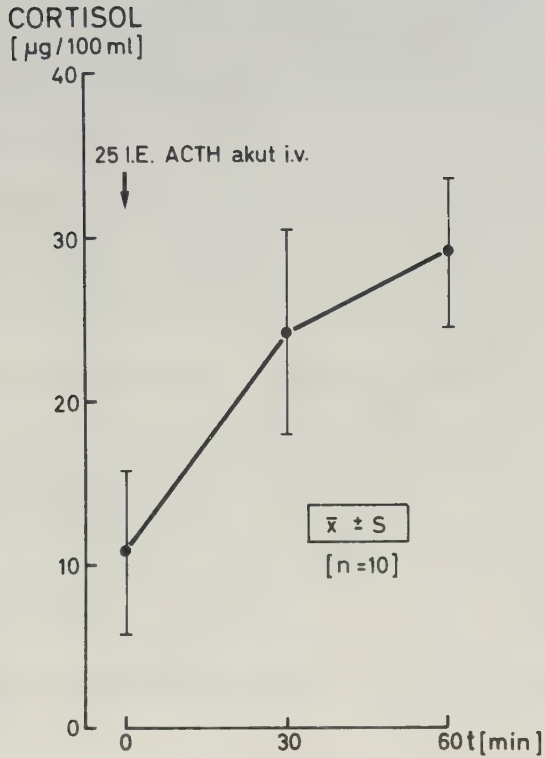


Abb. 9: Cortisolspiegel nach einer einmaligen Injektion von 25 I.E. ACTH.

Eingezeichnet sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte von 10 endokrin gesunden Patienten vor, sowie 30 und 60 Minuten nach ACTH-Gabe.

3.4.3. Dexamethason-Hemmtest

Dexamethason hemmt bereits in kleiner Menge gegeben die ACTH-Sekretion. Der Dexamethason-Hemmtest ist wichtig

1. zur Differentialdiagnose der ACTH-abhängigen oder autonomen Steroidüberproduktion in den Nebennieren (z.B. autonomer NNR-Tumor); hierbei wird Dexamethason in steigender Dosis über mehrere Tage gegeben (LIDDLE-Test).
2. Zur Überprüfung zwischen normalem und pathologischem Verhalten des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems durch quantitative Messung der Hemmbarkeit der ACTH-Sekretion, also insbesondere zum Ausschluß eines Cushing-Syndroms.

Wir führten den Dexamethason-Hemmtest als Kurztest durch für die unter 2. aufgeführte Fragestellung.

Dabei nahm man am Morgen des 1. Testtages den 9.00 Uhr-Nüchternwert (=Vergleichswert) ab. Am Abend desselben Tages verabreichte man dem Patienten gegen 22 Uhr oral 2 mg Dexamethason und 10 mg Valium. Um 9.00 Uhr des nächsten Tages erfolgte erneut eine Blutentnahme für den Wert nach Dexamethason. Wir führten diesen Test bei einem Kollektiv von 16 endokrin gesunden Patienten durch. Die Werte nach Dexamethason betrugen im Mittel $0,9 \pm 0,8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$); sie lagen in einem Bereich zwischen $0,1 - 2,8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol.

3.4.4. Cortisolspiegel unter einem Insulinhypoglykämietest

Der Insulinhypoglykämietest findet bei Patienten mit Verdacht auf eine partielle Hypophysenvorderlappeninsuffizienz mit der speziellen Fragestellung nach der Streßfähigkeit seine Anwendung.

Bei diesem Test kommt es zu einem Anstieg des Wachstumshormons (GH) und des Cortisols als Folge des Blutzuckerabfalls (49, 50). Bei normalgewichtigen gesunden Individuen genügt eine intravenöse Insulindosis von $0,15 \text{ I.E.}/\text{kg}$ Körpergewicht, um eine ausreichende Hypoglykämie zu erreichen (Blutzuckerwerte kleiner $45 \text{ mg}\%$). Patienten mit einem Insulinantagonismus (z.B. Adipositas, Akromegalie, Cushing) brauchen eine höhere Dosis, damit es zu einem ausreichenden Blutzuckerabfall kommt.

Wir injizierten bei 8 Patienten ohne endokrinologische Erkrankung eine Insulindosis von 0,15 I.E. Altinsulin/kg Körpergewicht akut i.v., nachdem wir 15 Minuten und unmittelbar vor der Injektion Blut entnommen hatten ($\sim 15,0$). Danach erfolgten weitere Blutentnahmen 30, 45, 60 und 90 Minuten nach der Insulingabe (Abb.10). Wir entnahmen jedesmal Blut zur Bestimmung von GH, Blutzucker (Blutzuckerwerte lagen unter 45 mg%) und Cortisol.

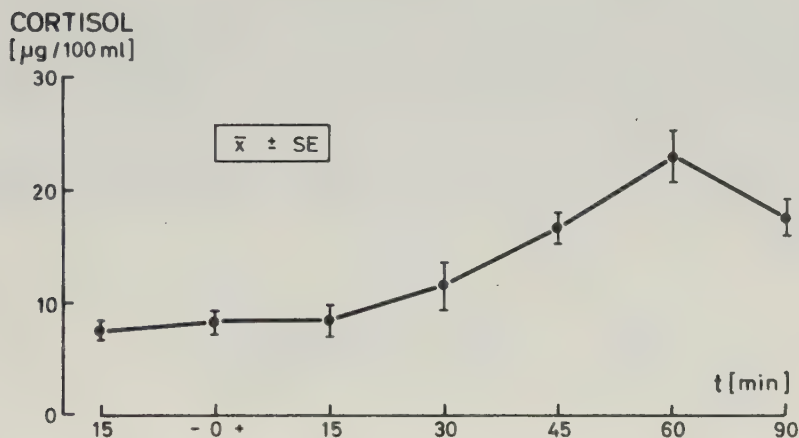


Abb. 10: Periphere Cortisolspiegel während eines Insulinhypoglykämie-Tests. Einzelheiten im Text.

In Tabelle 2 sind Zeitpunkt und Höhe des maximalen Cortisolanstiegs angegeben (t_{Max} , Δ_{Max}).

Tab. 2

Patient	t_{Max} (min)	Δ_{Max} (µg/100 ml Cortisol)
1	60	21,5
2	60	14,4
3	60	29,2
4	90	14,1
5	60	10,6
6	60	16,1
7	90	17,8
8	60	16,1

3.4.5. 9.00 Uhr-Nüchternwerte bei schwangeren Patientinnen und bei Patientinnen unter Antiovulantientherapie

Bei einem Kollektiv aus 11 schwangeren Patientinnen und 10 Patientinnen unter Antiovulantientherapie erfolgte um 9 Uhr eine Blutentnahme zur Messung des 9.00 Uhr-Nüchtern-Cortisolspiegels (5, 12, 16, 43). Dabei ergab sich für dieses Kollektiv ($N = 21$) ein Mittelwert von $20,0 \pm 8,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol.

Betrachtet man die beiden Gruppen des Kollektivs getrennt (Abb.11), so ergab sich für die schwangeren Patientinnen im Mittel ein Wert von $21,7 \pm 8,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$), in einem Bereich zwischen $11,4 - 34,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol.

Für die Patientinnen unter Antiovulantientherapie errechnete sich das Mittel zu $18,2 \pm 8,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$), in einem Bereich zwischen $8,2 - 33,6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol.

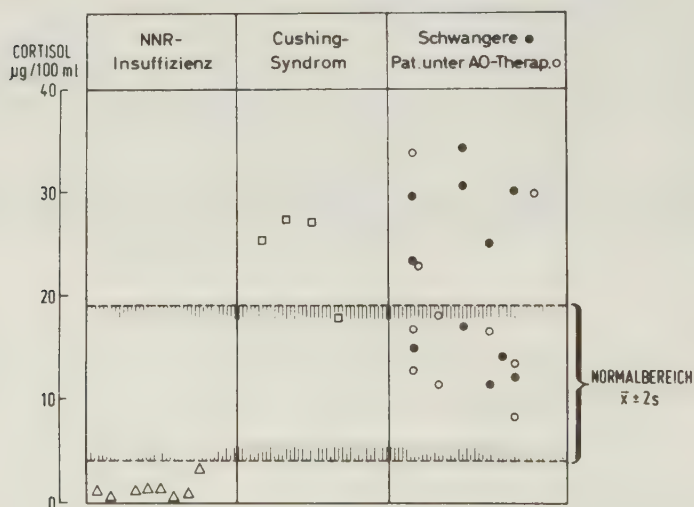


Abb. 11: Periphere Cortisolspiegel bei verschiedenen Funktionszuständen des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems unter AO-Therapie und bei Schwangeren.

In Tabelle 3 und 4 sind die Einzelwerte der untersuchten Personen, getrennt nach Schwangeren und Patientinnen unter Antiovulantien-therapie aufgeführt. Die 9.00 Uhr-Nüchternwerte des Gesamtkollektivs lagen also im Mittel erheblich über denen unseres 9.00 Uhr-Nüchternkollektivs (4,0 - 19,7 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol, $\bar{x} \pm 2s$; $\bar{x} = 8,9\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol) (Kap. 3.4.1.).

Unter Antiovulantientherapie bzw. bei Schwangeren kommt es zu einem Anstieg der Serumkonzentration des spezifischen Transportproteins für Cortisol, dem CBG (= Corticosteroid-binding-globulin) und dadurch zu einer Vermehrung des freien, nicht proteingebundenen Cortisols im Blut. Über den Rückkopplungsmechanismus (54) wird das Absinken des freien Hormonanteils durch vermehrte hypothalamisch-hypophysäre Stimulation der Nebenniere ausgeglichen, was zu einer Erhöhung des Gesamt-Cortisolspiegels führt.

Tab. 3: 9.00 Uhr-Nüchtern-Cortisolspiegel bei Schwangeren (N=11)

Patientin	Schwangerschaftswoche	$\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Cortisol
L.	37	34,0
Ku.	36	27,0
R.	32	14,0
L.	32	30,4
V.	31	14,6
I.	29	23,4
L.	28	24,8
H.	28	17,0
Ka.	23	12,3
L.	23	30,0
W.	20	14,0
$\bar{x} \pm s$	$29,0 \pm 5,4$	$21,7 \pm 8,1$

Tab. 4: 9.00 Uhr-Nüchternwerte bei Patientinnen unter Antiovlantientherapie (N=10)

Patientin	$\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$
Spi.	12,7
Kas.	11,2
Fr.	22,8
Fl.	33,6
Wo.	16,6
Wi.	18,0
Ka.	16,4
Spe.	13,2
D.	29,7
G.	8,2
$\bar{x} \pm s$	$18,2 \pm 8,1$

3.5. Erkrankungen des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems

3.5.1. Patienten mit Nebennierenrindeninsuffizienz

Zur Prüfung der Funktionsreserve der Nebennierenrinde ist bei Patienten mit Verdacht auf eine Nebennierenrindeninsuffizienz der ACTH-Test der wichtigste Stimulationstest.

Wir führten bei 8 Patienten mit Nebennierenrindeninsuffizienz (M.Addison, sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz, Zustand nach Adrenalektomie) einen ACTH-Belastungstest durch (Tab. 5). Nach Entnahme des 9.00 Uhr-Nüchternwertes (= Wert A) wurde eine Infusion (500 ml 0,9%ige NaCl), die 0,25 mg Synacthen (= 25 I.E.) enthält, angelegt. Die Infusion lief etwa 4 Stunden; anschließend wurde der B-Wert (= nach ACTH) abgenommen.

Bei diesem Kollektiv aus 8 Patienten lag der A-Wert in einem Bereich zwischen 0,6 - 3,2 $\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$ (Abb.11). Der Mittelwert errechnete sich zu $1,4 \pm 0,8 \mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$ ($\bar{x} \pm s$). Die B-Werte

lagen im Mittel um $2,1 \pm 2,6$ $\mu\text{g}/100$ ml Cortisol ($\bar{x} \pm s$); der niedrigste Wert war $0,3$ $\mu\text{g}/100$ ml Cortisol, der höchste $7,0$ $\mu\text{g}/100$ ml Cortisol.

Tab. 5

Patient	Diagnose	A-Wert $\mu\text{g}/100$ ml Cortisol	B-Wert $\mu\text{g}/100$ ml Cortisol
St.	M.Addison	1,3	5,7
Lö.	sekundäre NNR-Insuff.	0,7	0,5
Sa.	M.Addison	1,4	1,3
H.	Z.n.Adrenal- ektomie	1,4	0,9
A.	M.Addison	1,5	0,4
G.	M.Addison	0,6	0,3
Le.	M.Addison	0,9	1,0
Si.	M.Addison	3,2	7,0
$\bar{x} \pm s$		$1,4 \pm 0,8$	$2,1 \pm 2,6$

3.5.2. Patienten mit Cushing-Syndrom

Das Cushing-Syndrom ist definiert als ein Krankheitsbild mit einem Überangebot an Cortisol (32). Ursache hierfür können sein:

1. Adenome oder Carcinome der Nebennieren,
1. eine Störung des hypothalamisch-hypophysären Regulationsmechanismus,
3. eine verstärkte Stimulierung der Nebennieren durch ektopisch in nicht hypophysären Tumoren gebildetes ACTH,
4. exogene Corticoidzufuhr, die allerdings nur klinisch die Symptome eines Cushing-Syndroms macht, aber zur Atrophie der Nebennierenrinde führt und somit funktionell einer Nebennierenrindeninsuffizienz entspricht.

Wir untersuchten die Nüchtern-Cortisolspiegel von 4 Patienten mit gesichertem endogen bedingtem Cushing-Syndrom und fanden dabei Werte zwischen $17,4 - 27,2$ $\mu\text{g}/100$ ml Cortisol (Abb. 11).

3.6.

Vergleichende Untersuchung zur Spezifität
verschiedener radioimmunologischer Bestimmungs-
methoden mit demselben Antikörper

Wir hatten die Möglichkeit für einen Vergleich zwischen drei radioimmunologischen Bestimmungsmethoden, dem mechanisierten Cortisol-Radioimmunoassay (A), der in Kapitel 2 beschrieben wurde, einem Radioimmunoassay mit Dichlormethanextraktion, Inkubation und B/F-Trennung mit Kohle-Dextran (B) und einer radioimmunologischen Bestimmung nach vorheriger Abtrennung anderer Steroide durch Lösungsmittelverteilung (C) (44). Die Assays B und C wurden in der Universitätskinderklinik München, im Labor von Dr. F. Bidlingmaier, durchgeführt. Es wurde bei jeder Methode als Antikörper ein Kaninchen-Antiserum gegen C-21-Hemisuccinat-BSA-Konjugat des Cortisons (AK 1) verwandt.

Wir untersuchten die Spezifität für die radioimmunologische Cortisolbestimmung zunächst unter Einsatz von Methode A und B und fanden bei der Überprüfung der Mitreaktion anderer Steroidhormonstandards eine deutlich geringere Mitreaktion von Cortison, 17-OH-Progesteron, Progesteron, 11-Desoxycortisol, Corticosteron und Testosteron bei Assay A (Abb. 12). Zu erklären war die höhere Spezifität des mechanisierten RIA durch die Eigenschaft des Sephadex G-10, andere Steroide stärker als Cortisol zu binden (6, 38), so daß diese Steroide beim mechanisierten RIA weniger oder überhaupt nicht ins Meßergebnis eingingen.

Zur genaueren Erfassung der größeren Spezifität von Assay A und zur Erfassung der klinischen Bedeutung bei Serummessungen untersuchten wir parallel Seren derselben Patienten mit den drei oben erwähnten Bestimmungsmethoden. Fragestellung bei diesen Versuchen war für uns, ob wir bei Einsatz desselben Antikörpers ohne Vorreinigung eine annähernd hohe Spezifität beim mechanisierten RIA erzielen, wie nach vorheriger Abtrennung der meisten anderen Steroide. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6 bis 11 dargestellt.

Da bekannt ist, daß eine völlig spezifische Cortisolbestimmung im Serum nur nach chromatographischen Vorreinigungen möglich ist, war die größte Spezifität bei Assay C zu erwarten, weil zusätzlich zur Dichlormethanextraktion die Lösungsmittelverteilung vor den eigentlichen RIA eingeschaltet war. Tatsächlich aber lagen die Werte für den mechanisierten RIA zum Teil deutlich unter den Werten von Assay B und C.

Durch Lösungsmittelverteilung werden bestimmte Steroide, u.a. 17α -OH-Progesteron eliminiert (44). Die hohe Spezifität unseres Assays (A) zeigte sich z.B. durch die offensichtlich geringe Mitreaktion von 17α -OH-Progesteron, das ebenfalls auf der Säule retiniert wird (Patienten mit AGS-Syndrom unter Prednison-Therapie, Tab. 11). Die wesentlich niedrigeren Werte beim Nüchternkollektiv, bei Patienten unter einem ACTH-Test, bei Schwangeren und bei Patientinnen unter Antioovulantientherapie (Tab. 6, 7, 9, 10) lassen sich sicherlich nicht allein mit methodischen Schwankungen erklären, sondern dadurch, daß bestimmte Steroide nach Lösungsmittelverteilung noch vorhanden sind (44), die beim mechanisierten RIA (Assay A) auf der Säule retiniert werden und damit nicht ins Meßergebnis mit eingehen. Beim Cortisolspiegel nach Dexamethasongabe (Tab.8) könnte die Höhe der Werte von Assay C allerdings auch durch "Leerwertprobleme" in diesem Assay (40) zu erklären sein.

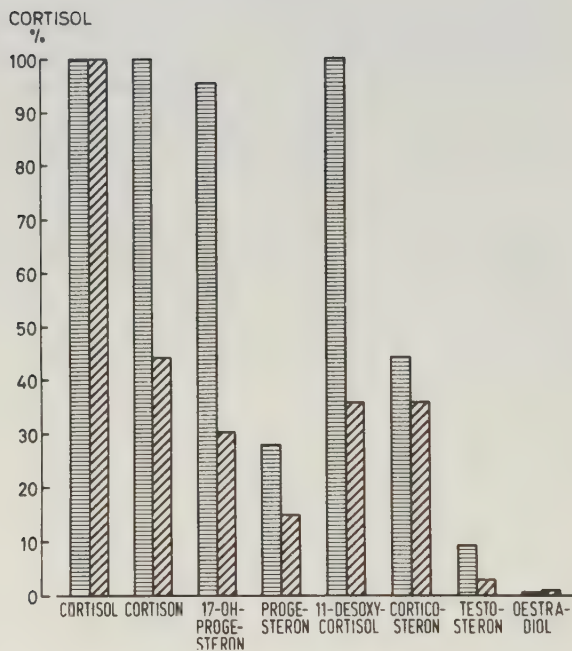


Abb. 12: Spezifitätsuntersuchung zweier radioimmunologischer Bestimmungsmethoden.

Eingezeichnet sind die Mitreaktionen verschiedener endogener Steroide in Prozent der Cortisolreaktion.

RIA nach Dichlormethanextraktion = linke Säule

Mechanisierter RIA = rechte Säule

Tab. 6:

Patient	mechanisierter		RIA mit Dichlor-		Nach Vorreinigung
		RIA µg/100 ml Cortisol	methanextraktion µg/100 ml Cortisol	RIA mit Dichlor- methanextraktion µg/100 ml Cortisol	
1. <u>E.My.</u>	10.00	13,3	35,0		
27.9.1974	13.00	1,9	10,0		
	15.00	3,9	10,4		
	18.00	3,0	6,9		
2. <u>Ze.</u>					
11.9.1974	9.00	12,0	18,9		
	15.00	10,4	14,2		
	18.00	8,4	7,8		
	22.00	4,7	4,2		
3. <u>W.S.</u>					
23.9.1974		14,4	14,9		
3 Tg.nach HCG		6,8	20,5		
1 Std.nach Synacthen		25,6	47,5		
4. <u>H.Mu.</u> 23.9.1974					
vor Synacthen		3,3	6,8		
nach Synacthen		9,6	41,0		
5. <u>De.</u>					
Vor Synacthen		10,3	19,7		
nach Synacthen		19,6	36,0		
6. <u>M.S.</u>	8.00	17,8	27,8	30,5	
	11.00	6,7	10,5	13,5	
	15.00	5,1	28,7	37,7	
	18.00	5,2	15,2	-	
	23.00	6,8	13,9	15,7	
7. <u>P.J.</u>	8.00	7,0	22,0	12,0	
	10.00	10,9	26,4	17,4	
8. <u>Si.</u>	0	6,8	27,5	20,4	
60 min nach Insulin		21,6	36,7	30,9	
9. <u>Schm.</u>	vor Dexa	11,0	17,6	11,2	
	nach Dexa	0,91	2,1	0,8	
10. <u>Eb.</u>	9.30	24,2	27,0	19,8	
	12.45	21,2	21,0	13,0	
	19.30	9,7	10,5	6,2	
11. <u>Bi.</u>	nüchtern	6,7	9,6	6,9	
	nach HCG	9,0	10,4	8,0	
12. <u>Schn.</u>	vor Synacthen	28,5	58,2	56,2	
	nach Synacthen	56,5	80,9	77,2	

Tab. 7: ACTH-Test mit Blutentnahme vor und 30 bzw. 60 Minuten nach Injektion von 0,25 mg Synacthen.

Mechanisierter RIA	RIA mit Dichlormethanextraktion	RIA mit Dichlormethanextraktion nach Vorreinigung
$\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$	$\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$	$\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$
0 (N=23) 30' (N=10) 60' (N=23)	0 (N=23) 30' (N=10) 60' (N=23)	0 (N=23) 30' (N=10) 60' (N=23)

$\bar{x} \pm s$	10,2 $\pm$ 5,6	23,2 $\pm$ 5,8	33,3 $\pm$ 8,2	20,8 $\pm$ 10,1	37,8 $\pm$ 7,6	45,1 $\pm$ 15,2	14,2 $\pm$ 8,8	19,1 $\pm$ 4,4	40,2 $\pm$ 11,2
$\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$									

Tab. 8: Werte nach Dexamethason.

N = 16	Mechanisierter RIA	RIA mit Dichlormethanextraktion	RIA mit Dichlormethanextraktion nach Vorreinigung
	$\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$	$\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$	$\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$

$\bar{x} \pm s$			
$\mu\text{g}/100 \text{ ml Cortisol}$	0,98 $\pm$ 0,97	4,2 $\pm$ 1,9	2,2 $\pm$ 1,3

Tab. 9: 9.00 Uhr-Nüchternwerte bei schwangeren Patientinnen.

N=11	Mechanisierter RIA	RIA mit Dichlor-methanextraktion	RIA mit Dichlor-methanextraktion nach Vorreinigung
	µg/100 ml Cortisol	µg/100 ml Cortisol	µg/100 ml Cortisol
$\bar{x} \pm s$			
µg/100 ml Cortisol	21,7 $\pm$ 8,1	43,0 $\pm$ 15,9	37,3 $\pm$ 13,0

Tab.10: 9.00 Uhr-Nüchternwerte bei Patientinnen unter Antiovlantien-Therapie.

	Mechanisierter RIA	RIA mit Dichlor-methanextraktion	nach Vorreinigung RIA mit Dichlor-methanextraktion
	µg/100 ml Cortisol	µg/100 ml Cortisol	µg/100 ml Cortisol
$\bar{x} \pm s$	16,5 $\pm$ 6,5	34,5 $\pm$ 16,2	27,5 $\pm$ 8,5

Tab.11: Patienten mit AGS-Syndrom unter Prednisontherapie.

	Mechanisierter RIA	RIA mit Dichlor-methanextraktion nach Vorreinigung
	µg/100 ml Cortisol	µg/100 ml Cortisol
G.F. vor Synacthen	5,9	7,3
G.F. nach Synacthen	7,0	5,9
R.B.	6,1	6,1
S.A.	4,6	3,5
S.S.	15,5	10,1

4.

DISKUSSION

Neben den verschiedenartigsten Möglichkeiten zur Bestimmung von Steroidhormonen, wie Calorimetrie, Fluorimetrie und Gaschromatographie (8), bedeutete das Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse von B.E.P.MURPHY einen gewaltigen Fortschritt auf dem Gebiet der Steroidanalytik. Immer wieder wurden in der Folgezeit methodische Verbesserungen veröffentlicht (9, 28, 45). Bei den bisher bekannten Methoden der Cortisolbestimmung im Serum mußte das Hormon durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (z.B. Dichlormethan) aus seinen Proteinbindungen freigesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode beschrieben, bei der die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln entfällt. Die hier erklärte radioimmunologische Bestimmungsmethode basiert auf dem früher beschriebenen Methodenprinzip für eine CPBA für Cortisol (6, 38). Die entscheidenden Schritte bei diesem Radioimmunoassay, die Extraktion, die Reaktion mit dem Antikörper, sowie die Trennung von proteingebundenem und freiem Anteil werden auf derselben Säule durchgeführt. Es findet keine Inkubation mit dem spezifischen Antikörper statt; die Antiserumlösung wird ebenfalls direkt auf die Säule aufgetragen und eluiert beim Säulendurchlauf je nach Konzentration des kalten Hormons mehr oder weniger Tracer. Der Vorteil einer Einsparung der Inkubationszeit ist allerdings mit einem Mehrbedarf an Antiserum verbunden. Der Antiserumtiter (1, 24) muß etwa um einen Faktor 5 - 10 niedriger gewählt werden als bei üblichen radioimmunologischen Bestimmungen mit Inkubation. Dieser Faktor würde allerdings nur dann ins Gewicht fallen, falls man Antiserum käuflich erwerben muß.

Dieses Methodenprinzip ermöglicht eine Mechanisierung; eine vollständige Mechanisierung des Analysenganges ist möglich, war aber wegen mangelnder Präzision des Prototypen bei der mechanisierten Säulenchromatographie für diesen Cortisol-RIA noch nicht optimal (Fa.Sartorius, Göttingen; Kap.2.4.).

Eine Vollautomatisierung der gesamten Methode, ausgehend vom Einsatz des Serums bis zum Endergebnis, war bisher nicht zu verwirklichen,

da zwischen der Analyse und dem Endergebnis die Aufbereitung der Proben mit Szintillationsflüssigkeit, der Zählvorgang und die Auswertung durch den Computer eingeschaltet sind.

Für den Kliniker ist ein Verfahren, das ihn schnell über das Resultat der Bestimmung orientiert, genauso wichtig, wie dessen Einfachheit, Preiswertigkeit, Empfindlichkeit, Spezifität, Genauigkeit und Richtigkeit.

Zur Schnelligkeit unserer Methode läßt sich sagen: Die reine Chromatographiezeit bei der Bestimmung von 12 Patientenseren mit Doppelwerten dauert genau 44 Minuten; an einen Durchgang kann sich dann sofort der nächste anschließen. Wir konnten ohne Schwierigkeiten 60 Patientenseren pro Tag bestimmen, wobei die weitere Aufbereitungszeit sowie die Auswertung der Meßergebnisse noch berücksichtigt werden muß.

Die relativ teuren Substanzen, die den Preis einer Bestimmung festlegen, sind die Gelsubstanz, der radioaktive Tracer und der Antikörper. Es ist jedoch gelungen, den Gel-Verbrauch dadurch einzuschränken, daß man durch einfaches Aufrühren des Gels nach einigen Durchgängen eine Weiterverwendung ermöglichte. Auf diese Weise konnten wir dieselben Säulen einige Wochen lang einsetzen.

Ein wichtiger Punkt bei der Diskussion einer Methode ist ihre Empfindlichkeit. ABRAHAM (2) spricht

1. von einer Empfindlichkeit der Standarddeichkurve,
2. von einer Empfindlichkeit des Assays.

Die Empfindlichkeit der Standarddeichkurve definiert er als die kleinste Menge eines Hormonstandards, die deutlich von Null zu unterscheiden ist. Sie hängt ab

1. von der Bindung zwischen der verwandten Antikörper-Lösung und dem Hormon, das gemessen werden soll,
2. von der Menge des im Assay eingesetzten radioaktiv markierten Hormons und der Menge des Antikörpers,
3. von der Genauigkeit des Assays.

Der steile (= empfindlichste) Abschnitt unserer Eichkurve lag im Bereich zwischen 0,2 - 2,0 ng Cortisol/Ansatz (= 100 µl). Eine größere Empfindlichkeit wäre ohne weiteres durch Änderungen der Versuchsbedingungen zu erreichen gewesen; für diagnostische Zwecke war dies jedoch nicht erforderlich.

Die Empfindlichkeit eines Assays hängt ab

1. von der Empfindlichkeit der Eichkurve,
2. von der Höhe des Leerwertes,
3. von der Wiederfinderate (Kap.3.1.2.).

Die Spezifität unseres Assays ist von der Spezifität des verwandten spezifischen Reagens, d.h. von der Affinität anderer endogener Steroide zum Antikörper abhängig. Dies zeigte sich bei einem Vergleich zwischen dem Antikörper 1 (einem Kaninchen-Antiserum gegen C 21-Hemisuccinat-BSA-Konjugat des Cortisons) und dem Antikörper 2 (einem Cortisol-21-Hemisuccinat-Rinderalbumin-Komplex). Der letztgenannte Antikörper erwies sich bei diesem Vergleich als gering spezifischer (Kap.3.2.1.). In unserem Fall ist die Spezifität ebenfalls eine Funktion der Affinität zum trennenden System, der Säule. Das von uns verwandte Sephadex G-10 vermag andere endogene Steroide z.T. stärker zu binden, als Cortisol. Dies zeigte der Vergleich unserer Methode mit zwei radioimmunologischen Bestimmungsmethoden (Kap.3.6.). Der von uns angegebene Normalbereich von $4,0 - 19,7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm 2s$, $\bar{x} = 8,9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol) liegt wesentlich niedriger, als der von FOSTER und DUNN (18) angegebene Normalbereich von $13,1 \pm 10,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol für einen RIA in nicht extrahiertem Serum. Der Normalbereich unseres RIA liegt auch beim Vergleich mit kompetitiven Proteinbindungsanalysen eher niedriger:

BRAUN et al. (39) $11,1 \pm 3,7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$),

ITURZAETA et al. (23) $11,7 \pm 3,7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$),

NEWSOME et al. (42) $12,3 \pm 0,8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$).

Trotzdem ist die Spezifität unseres Antikörpers nur relativ; absolut spezifisch wäre die Cortisolbestimmung nur dann, wenn ein Antikörper zur Verfügung stünde, der ausschließlich mit Cortisol reagiert. Für klinische Messungen jedoch ist die Spezifität unseres Antikörpers ausreichend.

Auf die Genauigkeit und Richtigkeit unserer Methode ist ausführlich in Kapitel 3 eingegangen worden.

Bei der Überprüfung der Präzision ergab sich ein Intraassay-Variationskoeffizient im mittleren Bereich von 7,8%, im Bereich

niedriger Konzentrationen von 21,7%. Bei der Kontrolle von Tag zu Tag (= Interassay-Variationskoeffizient) erhielten wir einen Variationskoeffizienten von 9,1%.

Die Richtigkeit (= Wiederfindenquote) betrug für unseren Cortisol-RIA im Bereich von 4 - 0,13 ng Cortisol pro Ansatz $95,8 \pm 7,3\%$ ($\bar{x} \pm s$).

Für eine zuverlässige Durchführung eines RIA sind banale Dinge, wie peinliche Sauberkeit, Achtsamkeit auf mögliche Fehlerquellen (undichtes Schlauchsystem, schlecht laufende Säulen), konstante Pipettierschritte, sowie das Wissen um mögliche, den Assay beeinflussende Substanzen von ausschlaggebender Wichtigkeit.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche zur Optimierung des Radioimmunoassays für Cortisol im Serum, sowie Versuche zur radioimmunologischen Bestimmung von Cortisol im Urin beschrieben.

1. Es konnte ein Radioimmunoassay für Cortisol ohne vorherige Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aufgebaut werden. Die drei wesentlichen Schritte finden auf derselben Säule statt: Die Extraktion von Cortisol aus seinen Proteinbindungen, die Reaktion mit dem Antikörper und die Trennung von gebundenem und freiem Cortisol. Die reine Chromatographiezeit dauerte 44 Minuten.

2. Die Methode wurde bezüglich Genauigkeit, Richtigkeit und Spezifität überprüft. Der Intraassay-VK liegt bei 7,8% (N=25), der Interassay-VK bei 9,1% (N=40). Die Wiederfindenquote für den Cortisol-RIA wurde im Bereich zwischen 4 - 0,13 ng mit $95,8 \pm 7,3$ % (N=9) ermittelt. Außerdem wurde die Mitreaktion anderer endogener Steroide, synthetischer Corticosteroide, sowie weiterer Störfaktoren untersucht. Beim Vergleich mit zwei anderen radioimmunologischen Methoden für Cortisol ergab sich auf Grund der stärkeren Bindung endogener und synthetischer Steroide an Sephadex G-10 eine deutlich höhere Spezifität des mechanisierten RIA.

3. Wir ermittelten einen Normalbereich für die Cortisol-Serummessung im Bereich zwischen 4,0 - 19,7 $\mu\text{g}/100$ ml Cortisol und verglichen unsere Ergebnisse mit anderen Bestimmungsmethoden (RIA, CPBA) für Cortisol. Es wurden zusätzlich Normalbereiche nach Stimulation (ACTH-, Insulinhypoglykämietest) und Suppression (Dexamethason-Hemmtest), sowie Cortisolspiegel bei verschiedenen pathologischen Funktionszuständen des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems angegeben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABRAHAM, G.E.:
Radioimmunoassay of steroids in biological materials.
Acta Endocr. Suppl. 183, p. 7-42 (1974)
2. ABRAHAM, G.E., W.D.ODELL:
Immunologic methods in steroid determination.
Appleton-Century-Crofts, New York 87 (1970)
3. BERSON, S.A., R.S.YALOW:
Quantitative aspects of reaction between insulin and insulin binding antibody.
J.clin.Invest. 38, 1959 (1966)
4. BLICHERT-TOFT, B., M.BLICHERT-TOFT:
Adrenocortical function in the aged, assessed by the rapid corticotrophin test (Synacthen).
Acta endocr. 64, 410 (1970)
5. BOTTERMANN, P., P.DIETERLE, W.HOCHHÄUSER, K.HORN, K.KOPETZ, K.SCHLEYPEN, K.SCHWARZ, P.C.SCRIBA:
Zur Frage der endokrinen Nebenwirkungen von Ovulationshemmern. Einfluß auf Glukosetoleranz, unveresterte Fettsäuren, Insulin- und Cortisolspiegel, sowie auf proteingebundenes Jod und Trijodthyronin im Serum.
Münch.med.Wschr. 109, 685-691 (1967)
6. BRAUN, J.:
Automatisierung der Bestimmung der Bindung von Cortisol an Serumproteine und des Gesamtcortisols im Serum (Competitive Proteinbindungsanalyse).
Inauguraldissertation Universität München 1974
7. BRAUN, J., O.A.MÜLLER, P.C.SCRIBA:
Automated competitive protein binding analysis and radioimmunoassay of serum cortisol without prior organic solvent extraction.
Acta endocr. 184, 64 (1974)
8. BREUER, H., W.NOCKE:
Bestimmung von Steroidhormonen.
Der Internist 9, Heft 2, 63-70 (1968)
9. BREUER, H., L.NOCKE, L.SIEKMANN:
Neue Methoden zur Bestimmung von Steroidhormonen.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 8, 329-338 (1970)

10. BUCHBORN, E., H.JAHRMÄRKER, H.J.KARL, G.A.MARTINI, W.MÜLLER,
G.RIECKER, H.SCHWIEGK, W.SIEGENTHALER, W.STICH:
Therapie innerer Krankheiten.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York,
p.515 (1973)
11. BURKE, C.W.:
Accurate measurement of steroid-protein binding
by steady state gel filtration.
Biochim.Biophys.Acta 176, 403 (1969)
12. BURKE, C.W.:
Biologically active cortisol in plasma of oestrogen-
treated and normal subjects.
British Medical Journal 2, 798-800 (1969)
13. CLARK, B.R., R.T.RUBIN, A.KALES, R.POLAND:
Comparison of fluorometric method for urinary
cortisol with modified Porter-Silber method for
17 - OHCS.
Clin.Chim.Acta 27, 364 (1970)
14. CLARK, B.R., R.T.RUBIN, R.E.POLAND:
Modification of new fluorometric method for
serum and urine cortisol.
Biochemical Medicine 5, 177-179 (1971)
15. DECK, K.A., L.EBERLEIN, H.VETTER, H.HILLEN:
Die Bestimmung von freiem Cortisol im Urin.
Dtsch.med.Wschr. 101, 818-821 (1976)
16. DOE, R.P., H.H.ZINNEMAN, E.B.FLINK, R.A.ULSTROM:
Significance of the concentration of nonprotein-
bound plasma cortisol in normal subjects,
Cushing's syndrome, pregnancy, and during
estrogen therapy.
J.Clin.Endocr. 20, 1484-1492 (1960)
17. DOERR, P., D.STAMM:
Bestimmung der 17-Hydroxycorticosteroide im Harn
unter Verwendung von Natriummetaperjodat.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 8, Nr. 3, 235-240 (1970)
18. FOSTER, B.B., R.T.DUNN:
Single-antibody technique for radioimmunoassay
of cortisol in unextracted serum or plasma.
Clinical Chemistry 20, 365-368 (1974)
19. HORN, K., J.HABERMANN, J.HENNER, I.zur HORST, P.C.SCRIBA:
Automatisierte Schilddrüsenhormonanalytik im Serum:
T₃-in vitro-Test und Gesamtthyroxin (CPB).
Z.Analyt.Chemie 259, 222, Abstract (1972)
20. HORN, K., J.HENNER, P.C.SCRIBA:
Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik.
II. Automatisierter T₃-in vitro-Test.
Dtsch.Ges.Klin.Chem. 2, 29 (1971)

21. HORN, K., T.RUHL, P.C.SCRIBA:
Semiautomatic method for the separation and determination of total triiodothyronine and thyroxin in serum.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 10, 99 (1972)
22. HSU, T.H., T.BLEDSE:
Measurement of urinary free corticoids by competitive protein-binding radioassay in hypoadrenal states.
J.Clin.Endocr. 30, Nr. 4, 443-448 (1970)
23. ITURZAETA, N.F., D.A.HILLMAN, E.COLLIE:
Measurement of plasma cortisol in children and adults: A comparison of the double isotope derivate assay, competitive protein-binding analysis and the modified competitive protein-binding analysis.
J.Clin.Endocr. 30, 185-189 (1970)
24. JAMES, V.H.T., S.L.JEFFCOATE:
Steroids.
Br.Med.Bull. 30, 50-54 (1974)
25. JAMES, V.H.T., J.LANDON:
Hypothalamic pituitary-adrenal function tests.
CIBA laboratories LTD, Horsham, Sussex, p.53 (1971)
26. JOHANSSON, E.D.B.:
Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal human menstrual cycle measured by a rapid competitive protein binding technique.
Acta Endocr. 61, 592-606 (1969)
27. KHAN, M.H., F.M.SULLIVAN:
In symposium on carbenoxolone sodium.
Ed. J.M. Robson and F.M. Sullivan, 1968, London, Butterworths.
28. KLEY, H.K.:
Aus: Methodische Schwierigkeiten der Proteinbindungsmethoden zur Bestimmung von Steroidhormonen: Bestimmung von Progesteron sowie von Cortisol und 11-Desoxycortisol mit Plasmaproteinen.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 357-361 (1973)
29. KNAPPE, G., F.STAHL: Ergebnisse eines intravenösen ACTH-Schnelltestes bei der Diagnostik der Nebennierenrindeninsuffizienz.
Endokrinologie 59, 307 (1972)

30. KÖBBERLING, J., A. von zur MÜHLEN:
The circadian rhythm of free cortisol determined
by urine sampling at two-hour intervals in normal
subjects and in patients with severe obesity
or Cushing's syndrome.
J.Clin.Endocr.Metab. 38, 313-319 (1974)
31. KUSCHINSKY, G., H.LÜLLMANN:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 6. Auflage, p.178,
(1974)
32. LABHART, A.:
Klinik der inneren Sekretion.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York,
2. Auflage, p.301 und p. 347-366 (1971)
33. LURIE, A.O.:
Plasma cortisol assay. Interference by
spironolactone.
J.A.M.A. 211, 1851-1852 (1970)
34. MARSCHNER, I., F.ERHARDT, P.C.SCRIBA:
The calculation of the radioimmunoassay
standard curve by "spline function".
IAEA, Symposium on radioimmunoassay and
related procedures in clinical medicine and
research.
Istanbul (1973) Abstract.
35. MATTINGLY, D., C.TYLER, E.BILTON:
Plasma 11-hydroxycorticoid levels after carbenoxol-
one sodium.
British Medical Journal 3, 498-500 (1970)
36. MAYNARD, D.E., R.L.FOLK, T.R.RILEY, R.G.WIELAND, G.GWINUP,
T.R.HAMWI:
A rapid test for adrenocortical insufficiency.
Ann. of Int.Med. 64, 522 (1966)
37. METCALF, M.G.:
Spironolactone and plasma cortisol.
Brit.Medical Journal 2, 1201 (1964)
38. MÜLLER, O.A., J.BRAUN, R.FRÜHLICH, P.C.SCRIBA:
Eine mechanisierte kompetitive Proteinbindungsanalyse
für Cortisol im Serum ohne vorherige Extraktion mit
organischen Lösungsmitteln.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12, 276-278 (1974)
39. MURPHY, B.E.P.:
Clinical evaluation of urinary cortisol determina-
tions by competitive protein-binding radioassay.
J.Clin.Endocr. 28, 343-348 (1968)

40. MURPHY, B.E.P.:
Protein binding and the assay of nonantigenic hormones.
Recent Prog. in Hormone Research 25, 563 (1969),
Academic Press, New York and London
41. MURPHY, B.E.P., W.ENGELBERG, C.J.PATTEE:
Simple method for the determination of plasma corticoids.
J.Clin.Endocr. 23, 293 (1963)
42. NEWSOME, H.H., A.S.CLEMENTS, E.H.BORUM:
The simultaneous assay of cortisol, corticosterone, 11-desoxycortisol, and cortisone in human plasma.
J.Clin.Endocr. 34, 473-483 (1972)
43. O'CONNELL, M., G.W.WELSH:
Unbound plasma cortisol in pregnant and Enovid-E treated women as determined by ultrafiltration.
J.Clin.Endocr. 29, 563-568 (1969)
44. PHAM-HUU-TRUNG, M.T., M.GOURMELEN, F.GIRARD:
The simultaneous assay of cortisol and 17 α -hydroxyprogesterone in the plasma of patients with congenital adrenal hyperplasia.
Acta Endocr. 74, 316-330 (1973)
45. PIRKE, K.M., D.STAMM:
Vergleich der Spezifität einfacher Methoden zur Bestimmung von Plasmacortisol.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 10, 254-259 (1972)
46. RADO, J.P., J.MAROSI, J.TAKO:
High doses of spironolactone (Aldactone, SC-14266) alone and in combination with triamterene and/or diuretics in the treatment of refractory edema associated with secondary hyperaldosteronism.
Endokrinologie 57, 46-62 (1970)
47. RADO, J.P., L.SZENDE, J.TAKO, O.NAGY:
Use of a simple fluorometric 11-hydroxy-corticosteroids assay in the assessment of spironolactone-metabolite level in plasma and urine.
Endokrinologie 64, Heft 1, 22-32 (1974)
48. RODBARD, D., J.E.LEWALD:
Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassay data.
Acta Endocr. Suppl. 147, 64 (1970)
49. ROTH, J.W., S.M.GLICK, R.S.YALOW, S.A.BERSON:
Hypoglycemia: A potent stimulus to secretion of growth hormone.
Science 140, 987 (1963)

50. ROTH, J.S., S.M.GLICK, R.S.YALOW, S.A.BERSON:
Secretion of human growth hormone: Physiologic
and experimental modification.
Metabolism 12, 577 (1963)
51. SCHETTLE, G.:
Innere Medizin.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage,
Band II, p.406 (1972)
52. SCRIBA, P.C., A.C.GERB, F.KLUGE, N.BOSS, O.A.MÜLLER:
Eine verbesserte fluorimetrische Serumcortisol-
bestimmung.
Z.Anal.Chem. 252, 284-287 (1970)
53. SCRIBA, P.C., O.A.MÜLLER:
Fluorimetrische Bestimmung von Cortisol im Serum.
Methoden der Hormonbestimmung.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, p. 181 (1975)
54. SIEGENTHALER, W.:
Klinische Pathophysiologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. überarbeitete
und erweiterte Auflage (1973)
55. SMITH, T.W., E.HABER:
Measurement of clinical blood levels of digoxin
by radioimmunoassay.
J.clin.Invest. 48, 78 (1969)
56. SPENCER-PEET, J., J.R.DALY, V.SMITH:
A simple method for improving the specificity of
the fluorimetric determination of the adrenal
corticosteroids in human plasma.
J.Endocr. 31, 235 (1965)
57. STAHL, F., G.DÖRNER:
Einfache Korrekturen zur Eliminierung unspezifischer
Fluorogene bei Steroidbestimmungen.
Acta Endocr. 68, 127-140 (1971)
58. STAIB, W.:
Steroidbestimmungen in Körperflüssigkeiten.
Dtsch.Med.Wschr. 87, 498-503 (1962)
59. STOLECKE, H.:
The determination of free urinary cortisol - A
modification of the method described by Gerdes
and Staib and normal values in infants.
Hormone and Metabolic Res. 2, Nr. 5, 298-301
(1970)

60. TAMM, J.:
Methodik, Fehlerquellen und Deutung der
Corticosteroidbestimmung im Harn.
Der Internist 4, Nr. 12, 559-566 (1963)
61. TAUSK, M.:
Pharmakologie der Hormone.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, p.22 (1970)
62. ULBRECHT, G., E.MEIER, R.ROTHENFUSSER, K.v.WERDER:
Time dependence of the flight induced increase
of free urinary cortisol secretion in jet pilots.
AGARD CONFERENCE, Pre-Print Nr. 146 on
Stimulation and Study of High Workland
Operations.
63. WEBER, C.:
Über den Synacthen-Kurztest.
Praxis 58, Nr. 27, 861 (1961)
64. WILDE, L., H.BENNICH, S.G.O.JOHANSSON:
Diagnosis of allergy by an in vitro test for
allergen antibodies.
The Lancet II, p. 1105 (1967)
65. WOOD, J.B., A.W.FRANKLAND, V.H.T.JAMES, J.LONDON:
A rapid test of adrenocortical function.
The Lancet, p.243 (1965)
66. WOOD, L.C., R.RICHARDS, S.H.INGBAR:
Interference in the measurement of plasma
1-hydroxycorticosteroids caused by spiro-
lactone administration.
New Engl.J.Med. 282, 650-652 (1970)

LEBENS LAUF

Am 1. Januar 1951 wurde ich, Marianne Krick, geb. Schmidberger, als Tochter des Amtsrates Josef Schmidberger und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Haas, in Friedberg geboren.

Nach Besuch der Volksschule trat ich 1961 in das Neusprachliche Gymnasium der Englischen Fräulein in Augsburg ein, wo ich 1970 die Reifeprüfung ablegte. Seit dem Wintersemester 1970/71 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Humanmedizin. Dort bestand ich 1971 die naturwissenschaftliche, 1973 die ärztliche Vorprüfung und am 3. August 1976 die ärztliche Prüfung.

Von November 1973 bis Sommer 1975 arbeitete ich in den Laboratorien für klinische Chemie und Endokrinologie (Leiter: Professor Dr. P.C.Scriba) an der damaligen II. Medizinischen Universitätsklinik, München (Direktor: Professor Dr.E.Buchborn) an der vorliegenden Dissertation.

Seit 19.12.1975 bin ich mit Dr.med. Lutz Krick verheiratet.

